



Mónica Andreia Monteiro Lopes

Licenciada em Química Aplicada

Estratégias sintéticas para a preparação de alcalóides aminoguanidina

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Química Bioorgânica

Orientador: Paula Branco, Professora auxiliar, FCT/UNL
Co-orientador: Ana Lourenço, Professora auxiliar, FCT/UNL

Júri:

Presidente: Prof. Doutor António Jorge Dias Parola

Arguente: Prof. Doutora Maria Manuela Marques Araújo Pereira

Vogal: Prof. Doutora Paula Cristina de Sérió Branco



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Outubro 2018



Mónica Andreia Monteiro Lopes

Licenciada em Química Aplicada

Estratégias sintéticas para a preparação de alcalóides aminoguanidina

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Química Bioorgânica

Orientador: Paula Branco, Professora auxiliar, FCT/UNL

Co-orientador: Ana Lourenço, Professora auxiliar, FCT/UNL

Júri:

Presidente: Prof. Doutor António Jorge Dias Parola

Arguente: Prof. Doutora Maria Manuela Marques Araújo Pereira

Vogal: Prof. Doutora Paula Cristina de Sérgio Branco

Estratégias sintéticas para a preparação de alcalóides aminoguanidina

Copyright © Mónica Andreia Monteiro Lopes, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa.

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado o crédito ao autor e editor.

Agradecimentos

Em primeiro lugar, agradeço às minhas orientadoras, a professora Paula Branco e a professora Ana Lourenço, assim como agradeço à professora Luísa Ferreira, por todo o apoio, paciência, conhecimentos transmitidos e interesse que demonstraram ao longo deste projeto. Foi um prazer enorme e privilégio trabalhar com professoras tão inspiradoras.

Gostaria de agradecer à Dr.^a Ana Teresa Lopes e à Dr.^a Luz Fernandes pela disponibilidade e simpática, assim como por todos os serviços prestados.

Agradeço a todo o pessoal dos laboratórios 202 e 205, por toda a simpatia e disponibilidade. Ao Rafael Mamede, à Patrícia Máximo, ao Ricardo Chagas, à Daniela Peixoto e à Cátia Santos, por todo o apoio que me deram no laboratório, pelas contribuições e sugestões para o desenvolvimento do trabalho. À Vanessa Sabino, à Gabriela Malta e ao Cristiano Conceição, por toda a amizade, companheirismo, mas em especial por conseguirem fazer-me sorrir nos dias mais complicados.

Por fim, um agradecimento muito especial à minha mãe, por apoiar-me incondicionalmente e por todo o esforço que fez para proporcionar-me esta oportunidade. Agradeço aos meus irmãos, por serem o meu motivo de orgulho e exemplos a seguir.

Não menos importante, agradeço à família que me foi permitida escolher, ao Tiago Machado, à Vitória Ruivo, ao Miguel Gomes, à Marta D'Almeida e à Andreia Marinho, por fazerem questão de tornar todos os momentos que passamos juntos memoráveis.

Resumo

A cernumidina é um alcalóide natural extraído das partes aéreas da planta *Solanum cernuum Vell.* Estudos biológicos apontam este alcalóide como potencial inibidor da produção de interleuquina-8 por células HT-29 de cancro do cólon. O alcalóide apresenta uma estrutura de carboxamidina condensada com uma unidade de ácido isoferúlico e a sua síntese em laboratório constitui um desafio.

Neste projeto foram explorados métodos para a obtenção de análogos da cernumidina com vista a uma futura aplicação na síntese da cernumidina. Numa primeira abordagem e em continuação de estudos já efetuados no laboratório, usou-se a L-prolina, devidamente protegida, como material de partida. Este método tinha como passo chave a síntese de isocianatos, via rearranjo de Curtius, para que estes, através de reações de nucleófilos de carbono, originem amidas. O passo seguinte, que envolvia a remoção do grupo protetor, mostrou ser problemático o que foi associado ao núcleo pirrolidina formado ser muito instável. Por fim este método envolvia a reação de guanilação para introdução do grupo carbodiimida.

A pequena viabilidade apresentada pela via a partir da L-prolina, guiou a investigação para uma segunda abordagem, que teve como material de partida a L-arginina. A L-arginina contém na sua estrutura um grupo guanidina, também presente na cernumidina. Através deste método foram desenvolvidos procedimentos para a acetilação do grupo alfa-amina da arginina com cloretos de acilo ou ácidos carboxílicos, mediados por agentes de acoplamento, com o objetivo de formar amidas. O passo seguinte deste procedimento envolvia uma reação de descarboxilação oxidativa radicalar por reagentes hipervalentes de iodo. Esta via demonstrou-se bastante promissora para a obtenção de análogos da cernumidina, tendo sido possível a síntese de três análogos do alcalóide.

A descarboxilação oxidativa radicalar representa o desafio desta metodologia, uma vez que a reação demonstrou ser incompleta e a purificação do crude originado bastante complicada. Apresenta também como desvantagem a perda da quiralidade no substrato.

Palavras chave: Cernumidina, L-prolina, rearranjo de Curtius, L-arginina, guanidina, descarboxilação oxidativa.

Abstract

Cernumidine is a natural alkaloid present in the leaves of *Solanum cernuum* Vell, that displays inhibition of interleukin-8 production in HT-29 colon carcinoma cells. The alkaloid presents a condensed carboxamidine structure with one isoferulic acid unit and his synthesis represent a challenge.

The aim of this project was to study routes to obtain the cernumidine and analogs. The first approach consisted of a continuation of already taken studies with L-proline, properly protected, as starting material. The key step of this methodology was the Curtius rearrangement of acyl azides to give isocyanates which can be attacked by nucleophilic carbons, to form amides. Once the amide was formed, the intent was to remove the protection groups of amines and proceed with a guanylation reaction, however, this step shows to be problematic, because of the instability of the pyrrolidine nuclei.

The inability to continue with the L-proline route guide us to the second approach, which counts with the L-arginine as the starting material. Like cernumidine, the L-arginine contains in its structure the guanine group. The first step of the new route was the acetylation of L-arginine with acyl chlorides or carboxylic acids mediated by coupling agents, to form amides. The second step involved a radicalar oxidative decarboxylation, by hypervalent iodine reagents. This pathway was shown to be very promising to obtaining the cernumidine and was possible to synthesize three cernumidine analogs.

The radicalar oxidative decarboxylation represents the challenge of this route because the reaction isn't complete and due to the similarity of the beginning and ending substrates the purification represents an issue. Another issue of radicalar oxidative decarboxylation is the loss of chirality in the carbon-nitrogen bond of the amide.

Keywords: Cernumidine, L-proline, Curtius rearrangement, L-arginine, guanidine, oxidative decarboxylation.

Índice de matérias

Agradecimentos.....	I
Resumo	III
Abstract	V
Índice de matérias	VII
Índice de figuras	XI
Índice de esquemas	XV
Índice de tabelas	XVII
Abreviaturas e nomenclaturas.....	XIX
I. Introdução.....	1
I.1 Produtos Naturais.....	3
I.2 Cernumidina	3
I.3 Síntese Enantiosseletiva	4
I.3.1 Síntese a partir de um material de partida quiral	4
I.3.2 Importância da síntese enantiosseletiva	5
I.4 Aminoácidos	6
I.4.1 Descarboxilação de aminoácidos.....	6
I.5 Guanidinas	8
I.5.1 Síntese de guanidinas.....	8
I.6 Aminas.....	9
I.6.1 Proteção e desproteção de aminas.....	9
I.7 Amidas.....	11
I.7.1 Síntese de amidas.....	11
I.7.1.1 Reações entre ácidos carboxílicos e aminas.....	12
I.7.1.2 Reações entre cloretos de acilo e aminas	13
I.7.1.3 Reações entre isocianatos e reagentes de Grignard	14
II. Discussão de Resultados.....	17
II.1 Preâmbulo	19
II.2 Metodologia adotada partindo da L-prolina.....	22

II.2.1	Reações de <i>N</i> -derivatização da L-prolina	22
II.2.1.1	Proteção do grupo amina	22
II.2.1.2	Inserção do grupo carbodiimida	27
II.2.2	Síntese de acilazidas	29
II.2.2.1	Envolvendo a formação de um anidrido misto	29
II.2.2.2	Envolvendo a formação de um cloreto de acilo	32
II.2.2.2.1.	Formação de acilazidas.....	36
II.2.3	Síntese de carbamoil azidas	38
II.2.4	Reações de derivados da L-prolina com nucleófilos de carbono	41
II.2.4.1	Reações entre isocianatos e nucleófilos de carbono	41
II.2.4.2	Reações entre carbamoilazidas e nucleófilos de carbono	47
II.2.5	Preparação do ácido carbâmico.....	49
II.2.6	Remoção dos grupos protetores	51
II.2.6.1	Remoção do grupo <i>tert</i> -butiloxycarbonil (Boc)	52
II.2.6.2	Remoção do grupo benziloxycarbonil (Cbz)	54
II.2.6.3	Remoção do grupo 9-fluorenilmetoxycarbonil (Fmoc)	58
II.2.7	Reações de Guanilação	59
II.2.7.1	Reações de guanilação do composto 36 , proveniente da remoção do grupo Boc	60
II.2.7.2	Reações de guanilação do composto 36 , proveniente da remoção do grupo Fmoc..	60
II.2.8	Reação de Arndt-Eistert	60
II.3	Metodologia adotada partindo da L-arginina.....	64
II.3.1	<i>Nα</i> -derivatização da L-arginina	64
II.3.1.1	Reações entre cloretos de acilo e a L-arginina	64
II.3.1.2	Reações entre ácidos carboxílicos e a L-arginina	69
II.3.2	Descarboxilação oxidativa.....	77
III.	Conclusões e Perspetivas futuras	85
III.	Conclusões e Perspetivas futuras	87
IV.	Parte Experimental	89
IV.1.	Preâmbulo	91
IV.2.	Reações de <i>N</i> -derivatização da L-prolina	93
IV.2.1.	Síntese da <i>N</i> - <i>tert</i> -butiloxycarbonil-S-prolina (7)	93

IV.2.2.	Síntese da <i>N</i> -benziloxycarbonil- <i>S</i> -prolina (8).....	93
IV.2.3.	Síntese da ((2',2',2'-triclouroetoxi)carbonil)- <i>S</i> -prolina (9).....	94
IV.2.4.	Síntese da <i>N,N'</i> -di(<i>tert</i> -butoxicarbonil)carbamimidoil- <i>S</i> -prolina (11).....	94
IV.3.	Síntese do 9-fluorenilmetil (<i>S</i>)-2-(clorocarbonil)pirrolidina-1-carboxilato (21).....	95
IV.4.	Síntese de acilazidas	96
IV.4.1.	Procedimento geral	96
IV.4.1.1.	Síntese da <i>tert</i> -butil-carboxilato 2- <i>S</i> -azidocarbonil pirrolidina (12)	96
IV.4.1.2.	Síntese do (<i>S</i>)-2-(azidocarbonil)pirrolidina-1-carboxilato de benzilo (13).....	97
IV.4.1.3.	Síntese do 2',2',2'-triclouroetil (<i>S</i>)-2-(azidocarbonil)pirrolidina-1-carboxilato (14)	97
IV.4.1.4.	Síntese da <i>N,N'</i> -di(<i>tert</i> -butoxicarbonil)carbamimidoil- <i>L</i> -prolinol azida (15).....	98
IV.4.2.	Síntese do 9-Fluorenilmetil (<i>S</i>)-2-(azidocarbonil)pirrolidina-1-carboxilato (22).....	98
IV.5.	Síntese do 9-Fluorenilmetil (<i>S</i>)-2-((azidocarbonil)amino) pirrolidina-1-carboxilato (26) .	99
IV.6.	Rearranjo de Curtius	99
IV.6.1.	Procedimento geral	99
IV.6.1.1.	Síntese de <i>N-tert</i> -butil 1-carboxilato-(<i>S</i>)-2-benzamido pirrolidina (27).....	100
IV.6.1.2.	(<i>S</i>)-2-benzamidopirrolidina-1-carboxilato de benzilo (28)	100
IV.6.1.3.	Síntese de (<i>S</i>)-2-benzamidopirrolidina-1-carboxilato de 2',2',2'-triclouroetil (29) ...	101
IV.7.	Síntese de 9-Fluorenilmetil (<i>S</i>)-2-benzamidopirrolidina-1-carboxilato (30).....	101
IV.8.	Síntese do ácido (1-(((9-fluorenil)metoxi)carbonil)-2-pirrolidinil)carbâmico (34).....	102
IV.9.	Síntese da (<i>S</i>)- <i>N</i> -2-pirrolidinil-benzamida (36).....	103
IV.9.1.	Por remoção do grupo protetor Boc.....	103
IV.9.2.	Por remoção do grupo protetor Cbz.....	103
IV.9.3.	Por remoção de grupo protetor Fmoc	104
IV.10.	Síntese de <i>N-tert</i> -butil ((2-benzamido-1-pirrolidinil)((<i>tert</i> -butoxicarbonil)imino)metil)carbamato (32).....	105
IV.11.	Síntese do ácido 2-((<i>S</i>)-1-fluorenilmetoxycarbonil)-2-pirrolidinil)acético (41)	107
IV.12.	Preparação de cloreto de (4-metoxifenil)acrilóilo (42)	108
IV.13.	Reações de proteção do ácido 3-hidroxi-4-metoxibenzoíco	108
IV.13.1.	Procedimento geral	108
IV.13.1.1.	Preparação do ácido 4-metoxi-3-(metoximetoxi)benzoico (49)	109
IV.13.1.2.	Preparação do ácido (<i>E</i>)-3-(4'-metoxi-3'-(metoximetoxi)fenil) acrílico (50)	109

IV.14.	Reações de <i>N</i> α -derivatização da L-arginina	110
IV.14.1.	Através da reação com cloretos de acilo	110
IV.14.1.1.	Procedimento geral	110
IV.14.1.1.1.	Síntese da <i>N</i> α -Benzoil-L-arginina (43).....	110
IV.14.1.1.2.	Síntese da (<i>E</i>)-(3-(4-Metoxifenil)acrilóil)-L-arginina (44).....	111
IV.14.2.	Através da reação com ácidos carboxílicos e recurso a reagente de acoplamento.....	111
IV.14.2.1.	Procedimento geral	111
IV.14.2.1.1.	Síntese da (4-metoxibenzoil)arginina (53)	112
IV.14.2.1.2.	Síntese da (4-metoxi-3-(metoximetoxi)benzoil) arginina (54)	113
IV.14.2.1.3.	Síntese da (<i>E</i>)-(3-(4-metoxi-3-(metoximetoxi)fenil)acrilóil) arginina (55)	113
IV.15.	Reações de descarboxilação oxidativa	114
IV.15.1.	Procedimento geral	114
IV.15.1.1.	Síntese da <i>N</i> -(1-Carbamidoilpirrolidina-2-il)benzamida (57)	114
IV.15.1.2.	Síntese da <i>N</i> -(1-carbamidoilpirrolidin-2-il)-4-metoxi benzamida (58).....	115
IV.15.1.3.	Síntese da (<i>E</i>)- <i>N</i> -(1-Carbamidoilpirrolidin-2-il)-3-(4-metoxifenil) acrilamida (59)	115
	Bibliografia.....	117
	Anexos.....	121

Índice de figuras

Figura 1 - A: Estrutura química da Cernumidina (1); B: Núcleo C4N-guanidina.....	3
Figura 2 - Exemplos de alguns compostos presentes na chiral pool.....	5
Figura 3 - Estruturas químicas da L-prolina (2) e da L-Arginina (3).....	6
Figura 4 - A: Guanidina (4); B: Guanidina parcialmente substituída; C: Guanidina totalmente substituída.	8
Figura 5 - Reagentes guanilantes mais comuns. ¹⁷	9
Figura 6 - Estrutura química dos grupos protetores de aminas, relevantes para o estudo atual.	10
Figura 7 - Representação da rotação intramolecular do composto 7 ; este fenómeno também é visível nos compostos 8 e 9	24
Figura 8 - Espectro de ¹ H-RMN do composto N-terc-butiloxycarbonil-S-prolina (7) realizado em CDCl ₃	24
Figura 9 - Espectro de ¹ H-RMN do composto N-benziloxycarbonil-S-prolina (8) realizado em CDCl ₃	25
Figura 10 - Espectro de ¹ H RMN do composto 2',2',2'-tricloetoxycarbonil-S-prolina (9), realizado em CDCl ₃	26
Figura 11 - Espectro de ¹ H-RMN do composto N,N'-di-(terc-butiloxycarbonil)carbamimidoil-S-prolina (11), realizado em (CD ₃) ₂ CO.....	28
Figura 12 - Espectro de IV do composto 14 , com evidência da formação do respetivo isocianato (19) e representação das respetivas estruturas químicas.	31
Figura 13 - Espetros de ¹ H-RMN do composto (N-Boc-acilazida) efetuados em CDCl ₃ , 10 minutos (1), 4 horas (2) e 24 horas (3) após a sua obtenção. ³⁰	32
Figura 14 - Espectro de ¹ H-RMN do composto 21 , obtido em CDCl ₃ e respetiva representação da estrutura química.....	34
Figura 15 - Comparação dos espectros de IV obtidos para o composto 21 . A: ampliação do espectro de IV do composto 21 obtido através da reação entre a N-Fmoc-prolina e cloreto de oxalilo na presença de DMF; B: ampliação do espectro de IV do composto 21 obtido através da reação da N-Fmoc-prolina e cloreto de tionilo.	36
Figura 16 - Espectro de ¹ H-RMN do composto 22 , realizado em CDCl ₃	37
Figura 17 - Estrutura química do grupo funcional carbamoil azida.....	38
Figura 18 - Espectro de ¹ H-RMN do composto 26 (N-Fmoc-carbamoil-azida), realizado em CDCl ₃	39
Figura 19 - espectro de ¹³ C-RMN do composto 26 (N-Fmoc-carbamoil azida), realizado em CDCl ₃	40
Figura 20 - Composto obtidos nas reações entre isocianatos e o brometo de fenilmagnésio: N-terc-butil 1-carboxilato-(S)-2-benzamido pirrolidina (27), (S)-2-benzamidopirrolidina-1-carboxilato	

de benzilo (28), (S)-2-benzamidopirrolidina-1-carboxilato de 2,2,2-tricloroetil (29), 9-Fluorenilmetil-(S)-2-benzamidopirrolidina-1-carboxilato (30), terc-butil (E)-((2-benzoilpirrolidin-1-il)((terc-butoxicarbonil)amino)metileno)carbamato (31).	42
Figura 21 - Espectro de ^1H -RMN do composto 27 , realizado em CDCl_3 com expansão da zona aromática.	43
Figura 22 - Espectro de ^1H -RMN do composto 28 , efetuado em CDCl_3 .	44
Figura 23 - Espectro de ^1H -RMN do composto 29 , realizado em CDCl_3 e respetiva expansão na zona aromática.	45
Figura 24 - Espectro de ^1H -RMN do composto 30 , obtido através da reação entre o isocianato e o brometo de fenilmagnésio, realizado em CDCl_3 .	46
Figura 25 - Estrutura dos compostos N-terc-butil ((2-benzamido-1-pirrolidinil)((terc-butoxicarbonil)imino)metil)carbamato (32) e terc-butil (E)-((2-benzoilpirrolidin-1-il)((terc-butoxicarbonil)amino)metileno)carbamato (31).	46
Figura 26 - Representação das gargas parciais das moléculas envolvidas na reação: N-Fmoc-carbamoil azida (26) e Brometo de fenilmagnésio (33).	47
Figura 27 - Espectro de ^{13}C -RMN do composto 30 , realizado em CDCl_3 .	49
Figura 28 - Espectro de ^1H -RMN do composto 34 N-Fmoc-ácido-carbâmico, realizado em CDCl_3 .	51
Figura 29 - Espectro de ^1H -RMN do composto 36 , obtido em D_2O .	54
Figura 30 - Espectro de ^1H -RMN obtido, com integração para o composto 36 e expansão na zona aromática com integração para a benzilamida.	56
Figura 31 - Ampliação dos espectros de CG-MS para os tempos de retenção de 7,5 minutos e 8 minutos, respetivamente.	57
Figura 32 - Possíveis fragmentações do composto 36 identificadas no espectro de GC-MS.	57
Figura 33 - Estruturas dos compostos obtidos com evidência para a diferença no espectro de ^1H -RMN.	62
Figura 34 - Ampliação do espectro de ^1H -RMN dos compostos 40 e 41 , realizado em CDCl_3 .	63
Figura 35 - Espectro de IV do composto 42 , realizado em filme em discos de NaCl .	65
Figura 36 - Espectro de ^1H -RMN do composto 43 , realizado em D_2O , com respetiva expansão da zona aromática.	67
Figura 37 - Espectro de ^1H -RMN dos compostos 44 e 45 , efetuado em D_2O , com expansão da respetiva zona aromática e identificação e integração dos sinais para o composto 45 .	68
Figura 38 - Ampliação, na zona aromática, do espectro de ^1H -RMN dos compostos 44 e 45 , com respetivas identificação de sinais de protão, integração e representação da estruturas químicas.	69
Figura 39 - Estrutura dos ácidos carboxílicos usados na α -derivatização da L-arginina, através de reações mediadas por agentes de acoplamento.	70
Figura 40 - Espectro de ^1H -RMN do composto 51 , realizado em CDCl_3 , com respetiva expansão da zona aromática.	71
Figura 41 - Ampliação do espectro de ^1H -RMN do composto 50 , realizado em CDCl_3 .	72

Figura 42 - Representação dos produtos obtidos através da reação entre ácidos carboxílicos e aminas, e respectivos rendimentos.....	73
Figura 43 - Espectro de ^1H -RMN do composto (4-metoxibenzoil)arginina (53), obtido em MeOD.	74
Figura 44 - Espectro de ^1H -RMN do composto 54 , efetuado em CDCl_3 , com respectiva expansão na zona aromática.	75
Figura 45 - Ampliação do espectro ^1H -RMN do composto 55 , efetuado em MeOD.....	76
Figura 46 - Ampliação, na zona aromática, do espectro de ^1H -RMN dos compostos 55 e 56 , com respectivas identificação de sinais de próton, integração e representação da estruturas químicas.	77
Figura 47 - Representação dos compostos obtidos através das reações de descarboxilação oxidativa radicalar.	78
Figura 48 - Espectro de ^1H -RMN para o composto 57 , entrada D - tabela 2.....	79
Figura 49 - Espectro de LC-MS dos compostos obtidos através da descarboxilação oxidativa do composto N_α -benzoil-L-arginina (43).....	80
Figura 50 – Espectro de ^1H -RMN do composto N-(1-carbamimidoilpirrolidin-2-il)-4-metoxi benzamida (58).....	81
Figura 51 - Espectro de LC-MS do composto 58	82
Figura 52 - Espectro de ^1H -RMN do composto 59 , realizado em CD_3OD	83
Figura 53 -Ampliação, na zona aromática, do espectro de ^1H -RMN dos compostos 59 e 60 , com respectivas identificação de sinais de próton, integração e representação da estruturas químicas.	84

Índice de esquemas

Esquema 1 - Mecanismo da descarboxilação redutiva de Barton. ¹⁴	7
Esquema 2 - Estratégia de síntese para pirrolidinas 2-substituídas. ^{13a}	7
Esquema 3 - Esquema reacional de uma reação de guanilação. ¹⁷	8
Esquema 4 – Demonstração geral de alguns grupos de proteção de aminas e as condições reacionais mais comuns de desproteção. ¹⁸⁻¹⁹	10
Esquema 5 - Formação da ligação éster versus ligação amida. ²²	11
Esquema 6 - Ativação do ácidos carboxílicos seguido de uma aminólise. ²²	12
Esquema 7 - Acoplamento através do uso do agente de acoplamento DCC. ²³	13
Esquema 8 - Esquema de reação de acilação de aminas com cloretos de acilo. ²²	13
Esquema 9 - Estruturas de ressonância do isocianato.	14
Esquema 10 - Mecanismo do rearranjo de Curtius	14
Esquema 11 - Esquema de adição de organometálicos a isocianatos, seguido de hidrólise. ²⁷	15
Esquema 12 - Proposta de síntese para os compostos N-terc-butiloxycarbonil-S-prolina (7), N-benziloxycarbonil-S-prolina (8) e ((2',2',2'-tricloroetoxi)carbonil)-S-prolina (9).	22
Esquema 13 - Mecanismo geral de proteção da L-prolina com dicarbonato de di-terc-butilo (Boc ₂ O), cloroformiato de benzilo (Cbz-Cl) ou 2,2,2- tricloroetoxycarbonil (Troc-Cl).	23
Esquema 14 – Mecanismo da reação de guanilação para preparação do composto 11	27
Esquema 15 - Metodologia adotada para a síntese dos compostos terc-butil-carboxilato 2-S-azidocarbonil pirrolidina (12), (S)-2-(azidocarbonil)pirrolidina-1-carboxilato de benzilo (13), 2',2',2'-tricloroetil (S)-2-(azidocarbonil)pirrolidina-1-carboxilato (14) e N,N-di(terc-butoxycarbonil)carbamimidoil-L-prolinoil azida(15).	30
Esquema 16 - Mecanismo geral para a síntese de acilazidas, envolvendo o anidrido misto....	30
Esquema 17 - Metodologias adotadas para a síntese de N-Fmoc-acilazida (22) a partir da N-Fmoc-prolina (20) através da preparação do cloreto de acilo, usando cloreto de oxalilo (método A) ou cloreto de tionilo (método B).	33
Esquema 18 - Mecanismo da formação do cloreto de acilo, a partir de um ácido carboxílico e de cloreto de oxalilo, na presença de DMF.	33
Esquema 19 - Mecanismo da formação do cloreto de acilo, a partir de um ácido carboxílico e de cloreto de tionilo.	35
Esquema 20 - Mecanismo da reação entre cloretos de acilo e a azida de sódio, que dá origem ao composto 9-fluorenilmetil (S)-2-(azidocarbonil)pirrolidina-1-carboxilato (22).	36
Esquema 21 - Metodologia adotada para a obtenção da N-Fmoc-carbamioilazida (26) a partir do composto 21	38
Esquema 22 - Método adotado para a síntese de amidas, a partir de acilazidas, por rearranjo de Curtius.	41

Esquema 23 - Método adotado para a reação entre carbamoil azidas e nucleófilos de carbono.	48
Esquema 24 - Mecanismo de reação entre a N-Fmoc-carbamoil-azida (26) e o brometo de fenilmagnésio (33).	48
Esquema 25 - Método proposto para a derivatização do grupo carbamoilazida.	50
Esquema 26 – Metodologias adotadas para a obtenção do composto (S)-N-2-pirrolidinil-benzamida (36).	52
Esquema 27 - Mecanismo de remoção ácida do grupo protetor Boc.	53
Esquema 28 - Mecanismo reacional para a, obtenção do composto 36 , por remoção do grupo Cbz.	55
Esquema 29 - Mecanismo de remoção do grupo protetor Fmoc.	58
Esquema 30 - Metodologia adotada para a formação do composto 32	59
Esquema 31 - Reação de Arndt-Eistert.	61
Esquema 32 - Mecanismo da reação de Arndt-Eistert	61
Esquema 33 - Metodologia adotada para a síntese da Cernumidina e análogos partindo da L-arginina.	64
Esquema 34 - Mecanismo da reação entre aminas e cloretos de acilo e representação das estruturas dos compostos obtidos.	66
Esquema 35 - Mecanismo reacional da reação entre ácidos carboxílicos e aminas, mediado por CDD/NHS.	73
Esquema 36 - Mecanismo da descarboxilação oxidativa radicalar.	78

Índice de tabelas

Tabela 1 - Condições experimentais adotadas na reação de descarboxilação oxidativa do composto 43 ; nos métodos de purificação a coluna de cromatografia foi realizada com sílica RP-18; as extrações referem-se a lavagens do crude com metanol e diclorometano.	79
--	----

Abreviaturas e nomenclaturas

Δ	Aquecimento
δ	Desvio químico
ν	Número de onda (cm^{-1})
^{13}C-RMN	Ressonância Magnética Nuclear de carbono
^1H-RMN	Ressonância Magnética Nuclear de próton
AIBN	α,α' -Azoisobutironitrilo
Boc	<i>tert</i> -butoxicarbonilo
Cbz	benziloxycarbonilo
Cbz-Cl	Cloroformiato de benzilo
c.c.f.	Cromatografia de camada fina
d	duplete
dd	duplete de duplete
DCC	1,3-Diciclo-hexilcarbodiimida
DIB	(diacetoxiyodo)benzeno
DIC	<i>N,N'</i> -Diisopropilcarbodiimida
DMAP	4-Dimetilaminopiridina
DMF	Dimetilformamida
eq	equivalente
ESI	Ionização por eletrospray
Fmoc	Cloroformiato de 9-fluorenilmetilo
GC	Cromatografia gasosa
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
IV	Infravermelho
IL-8	Interleuquina-8
<i>J</i>	Constante de acoplamento
LC	Cromatografia líquida
m	Multiplete
MOMBr	Bromo metoximetano
MS	Espectrometria de massa
<i>m/z</i>	Razão massa/carga
NHS	<i>N</i> -hidroxi-succinimida
NMO	<i>N</i> -metil-morfolina
ppm	partes por milhão
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
Rt	<i>Room temperature</i>
s	<i>singuleto</i>

sl	<i>singuleto largo</i>
t	<i>tripleto</i>
TFA	Ácido trifluoracético
THF	Tetra hidro furano
Troc	2,2,2-tricloroetoxicarbonil
Troc-Cl	Cloroformiato de 2,2,2-tricloroetil

I. Introdução

I.1 Produtos Naturais

A história da medicina remonta à existência da civilização humana, onde os produtos naturais já eram usados com fins curativos. Desde essa altura até ao início do século XX os medicamentos eram o crude ou extratos semipuros de plantas, animais, micróbios e minerais.¹

No início do século XX, o fisiologista John Newport Langley e o físico e cientista Paul Ehrlich introduziram a teoria do recetor. Esta teoria explica que o comportamento dos fármacos no corpo humano é mediado através de interações específicas, entre o fármaco e macromoléculas biológicas, como proteínas e ácidos nucleicos. Esta nova teoria guiou à conclusão que os compostos químicos puros e isolados eram preferíveis aos extratos brutos ou semipuros.^{1a}

A partir desse marco, muitas estruturas químicas de vários compostos naturais bioativos foram elucidadas e atualmente, os produtos naturais puros, tornaram-se na base de inúmeros fármacos.^{1a}

I.2 Cernumidina

Solanum cernuum Vell (Solanaceae) é uma planta que cresce espontaneamente no sul e sudeste do Brasil. Esta planta é largamente utilizada na medicina tradicional brasileira. Infusões das partes aéreas da planta, assim como, das raízes têm aplicações no tratamento de inúmeras patologias como, úlceras gástricas, hemorragias, lesões hepáticas, infeções dermatológicas, entre outras, sendo também usada com agente antitumoral.²

Ao longo dos últimos anos a constituição das folhas e caules desta planta têm sido estudadas, já foram identificados mais de 200 fungos e inúmeros metabolitos secundários como, flavonóides, terpenos e alcalóides.³ Alguns destes metabolitos apresentam atividade biológica contra linhagens de células tumorais, como é o caso do alcalóide cernumidina (**1**) (figura 1), que apresenta uma atividade biológica bastante seletiva.⁴

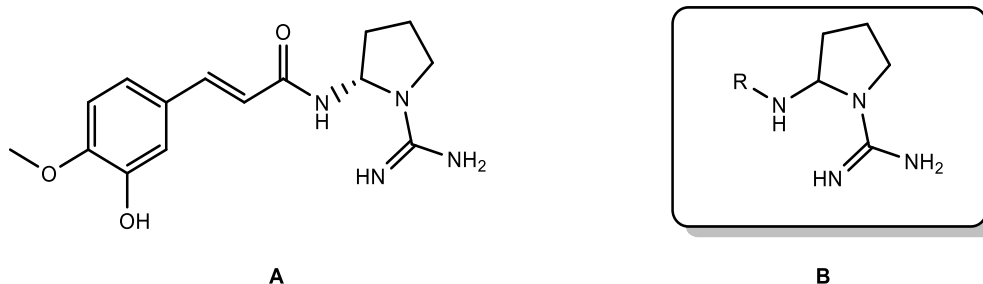


Figura 1 - A: Estrutura química da Cernumidina (**1**); **B:** Núcleo C4N-guanidina.

A cernumidina apresenta uma estrutura resultante da condensação, na forma de amida, da unidade (2-aminopirrolidin-1-il)carboxamidina com uma unidade de ácido isoferúlico apresentando um centro estereogénico. Na estrutura do composto é ainda possível observar a presença de cinco ligações C-N consecutivas, que formam um núcleo C4N-guanidina (figura 1), até este momento desconhecido na literatura.⁴

Estudos biológicos do alcalóide revelam que este manifesta inibição da interleuquina-8 (IL-8) produzidas pelas células HT-29 do carcinoma do cólon. A cernumidina apresenta-se então promissora para o tratamento do cancro do colon, o terceiro mais incidente, a nível mundial.⁴⁻⁵

I.3 Síntese Enantiosseletiva

De acordo com a IUPAC, os enantiómeros formam um par de moléculas que são a imagem no espelho plano uma da outra, que não são sobreponíveis. Os enantiómeros possuem atividade ótica, uma vez que apresentam pelo menos um centro quiral, característica responsável pela capacidade destes rodarem o plano da luz polarizada (-/+) em quantidades iguais, mas em sentidos opostos.⁶

Designa-se mistura racémica, ou racemato, a uma mistura onde os dois enantiómeros estão presentes em quantidades iguais.⁷

Atualmente é possível obter compostos enantiomericamente puros através das seguintes metodologias: resolução de uma mistura racémica, uso de um material de partida quiral ou uso de auxiliares quirais, com o objetivo de introduzir um centro quiral numa molécula proquiral.⁸

I.3.1 Síntese a partir de um material de partida quiral

O uso de um produto natural, enantiomericamente puro é um método económico de sintetizar um enantiómero puro. Este método, mais conhecido como *chiral pool strategy*, baseia-se no uso de um produto natural, óticamente ativo e que já contenha centros estereogénicos apropriados, como precursores da molécula alvo.⁸

Aminoácidos, alcalóides, hidratos de carbono e terpenos representam alguns dos materiais de partida mais utilizados neste método (figura 2).

Este método já foi o mais utilizado para a síntese de compostos quirais com potencial uso terapêutico, no entanto atualmente apenas 25% dos fármacos comercializados são sintetizados através deste método.⁹

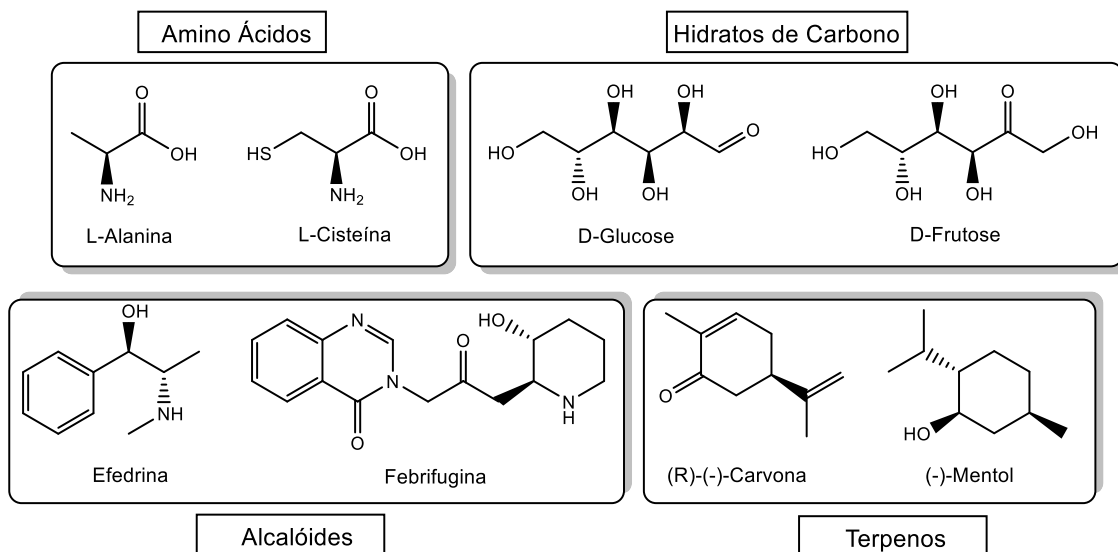


Figura 2 - Exemplos de alguns compostos presentes na chiral pool.

I.3.2 Importância da síntese enantiosseletiva

Louis Pasteur introduziu o conceito de quiralidade quando, em 1848, descobriu que os sais do ácido tartárico existiam em duas formas isoméricas. Mais tarde Pasteur verificou que as diferentes formas do ácido tartárico eram fermentadas de forma distinta pelas leveduras, indicando a possibilidade dos sistemas vivos conseguirem diferenciar as duas formas. Contudo apenas no século seguinte é que o fenómeno da quiralidade foi considerado relevante, tanto para a vida animal e como das plantas, como para várias indústrias, incluindo a farmacêutica.¹⁰

Esta importância remete ao facto da quiralidade estar presente em proteínas, aminoácidos, ácidos nucleicos, hormonas e outros compostos essenciais à vida humana. Investigadores e entidades reguladores reconhecem a importância da estereoquímica na ação de um fármaco. Fármacos enantioméricos representam um papel crescente na indústria farmacêutica, 98% dos fármacos naturais ou semissintéticos, descritos na *Pharmacopeia*, são quirais, quanto aos fármacos totalmente sintéticos, apenas 40% são quirais e 87% são racematos.¹⁰

Apesar de um par de enantiómeros apresentar o mesmo número de átomos e grupos funcionais, estes ocupam posições espaciais diferentes, o que pode influenciar as interações num ambiente assimétrico de recetores e enzimas. Um par de enantiómeros pode ter efeitos farmacológicos qualitativa e quantitativamente diferentes, facto este que está relacionado com a farmacodinâmica e farmacocinética estereosseletivas.

Inúmeros estudos já comprovaram que, mesmo que o par de enantiómeros apresente atividade biológica semelhante, esta pode ser quantitativamente diferente. É ainda possível que

apenas um dos enantiómeros exiba a atividade biológica desejada, sendo o outro considerado uma impureza, que pode não ter nenhuma atividade biológica ou em casos extremos apresentar uma atividade biológica muito prejudicial, como é o caso da talidomida.^{1a, 10}

I.4 Aminoácidos

Como anteriormente referido, os aminoácidos representam um excelente material de partida para a síntese enantiosseletiva. A maioria dos vinte aminoácidos comuns apresenta um centro quiral, e pelo menos dois grupos funcionais, que podem ser, quimicamente transformados de modo a originar a molécula alvo.¹¹

No estudo em questão apenas serão abordados dois dos vinte aminoácidos comuns, a L-prolina (**2**) e a L-arginina (**3**) (figura 3). Estudos anteriores, assim como a análise da via biosintética proposta para a cernumidina, demonstraram que estes dois aminoácidos, não essenciais, representam materiais de partida promissores para a síntese da cernumidina.⁴

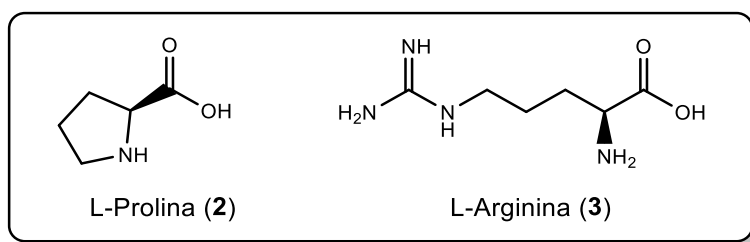


Figura 3 - Estruturas químicas da L-prolina (**2**) e da L-Arginina (**3**).

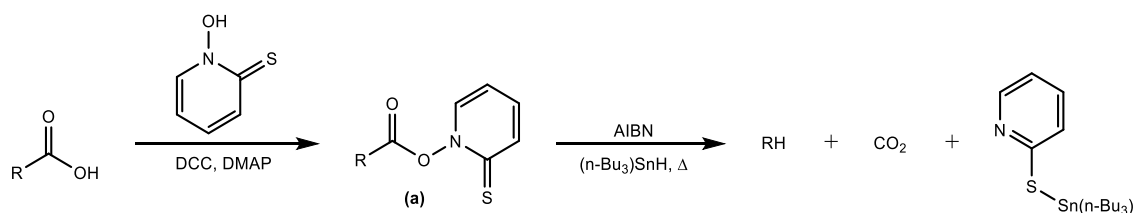
I.4.1 Descarboxilação de aminoácidos

A descarboxilação de aminoácidos é uma reação que, normalmente, leva à obtenção de aminas, com inúmeros usos, como a síntese de compostos opticamente ativos ou preparação de auxiliares quirais, úteis na síntese assimétrica.¹²

Estão descritos na literatura inúmeros métodos baseados na descarboxilação enzimática, assim como métodos não enzimáticos que incluem modelagem de métodos enzimáticos, irradiação com luz ultravioleta (UV), aquecimento num solvente de difenilmetano ou termólise em solventes que possuem pontos de ebulição elevados na presença de peróxidos como catalisadores.¹²

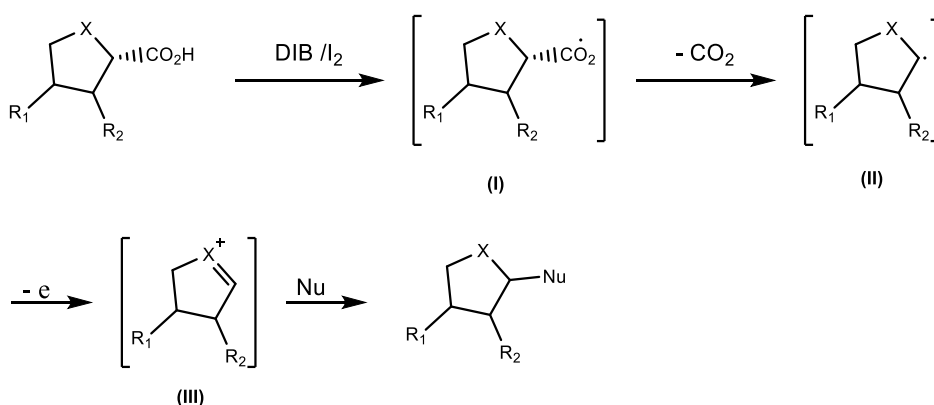
A descarboxilação radicalar apresenta um método alternativo para a obtenção de aminas e pode ser realizada em condições redutivas, assim como condições oxidativas.¹³

A descarboxilação de Barton é um exemplo de descarboxilação redutiva radicalar, que pode ser aplicada a aminoácidos. Neste caso o ácido carboxílico é convertido no éster de Barton (a), posteriormente o éster é aquecido na presença de um iniciador radicalar (AIBN) e de um agente dador de hidrogénio ((n-Bu₃)SnH), conduzindo assim à descarboxilação redutiva radicalar (esquema 1).¹⁴



Esquema 1 - Mecanismo da descarboxilação redutiva de Barton.¹⁴

No caso da descarboxilação oxidativa radicalar, quando o carbono radicalar está adjacente a um átomo de azoto, este pode ser oxidado a uma espécie acil imínio. Um dos procedimentos envolve o uso de (diacetoxiiodo)benzeno (DIB) e iodo com a formação de um radical carboxilo (I), que por perda de CO₂, dá origem a um radical alquilo (II); o radical resultante, por estar adjacente a um átomo de azoto, origina o catião intermediário *N*-acilimínio (III) que pode ser capturado por nucleófilos presentes na mistura reacional (esquema 2). O intermediário catião *N*-acilimínio pode ser armadilhado por nucleófilos inter- ou intramolecular. A prolina, devidamente protegida no átomo de azoto foi utilizada por Boto e colaboradores em diversos processos de transformação envolvendo esta reação.¹³



X = O, NCOR

R₁, R₂ = H, alquilo, O-alquilo

Esquema 2 - Estratégia de síntese para pirrolidinas 2-substituídas.^{13a}

I.5 Guanidinas

As guanidinas são substâncias cristalinas, bastantes básicas que representam componentes estruturais importantes de vários compostos biologicamente ativos, como é o exemplo da L-arginina (**3**). Este grupo funcional tem aplicações em várias áreas da química.¹⁵

Devido ao seu caráter fortemente básico, as guanidinas estão protonadas em condições fisiológicas.¹⁵⁻¹⁶ A carga positiva, assim imposta na molécula, constitui a base para interações específicas entre ligando-recetor ou enzima-substrato, mediadas por pontes de hidrogénio e/ou interações eletrostáticas.¹⁶

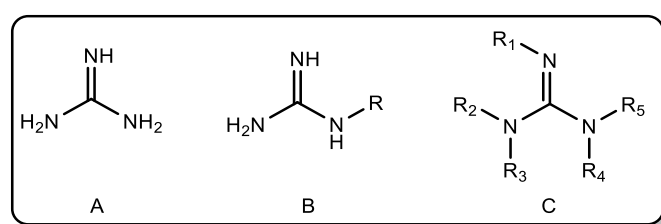
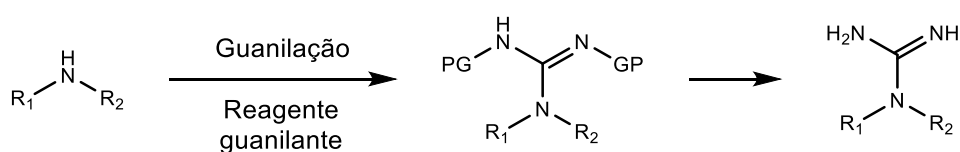


Figura 4 - **A:** Guanidina (**4**); **B:** Guanidina parcialmente substituída; **C:** Guanidina totalmente substituída.

Guanidinas substituídas, de origem natural ou sintética, representam um desafio como alvos sintéticos. Podem conter vários padrões de substituição incluindo grupos alquila ou arila, presentes em vários estados de oxidação. Para além disso, a alta basicidade, polaridade e consequente solubilidade em água, também causam várias dificuldades experimentais tanto no isolamento, como na síntese de moléculas que contêm este grupo funcional.¹⁷

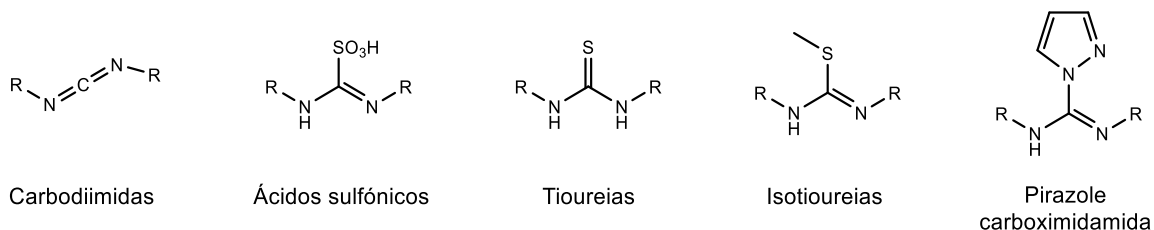
I.5.1 Síntese de guanidinas

A síntese de guanidinas é tradicionalmente denominada por guanilação (esquema 3). A guanilação, normalmente, envolve a reação entre uma amina primária ou secundária e um reagente guanilante.¹⁷



Esquema 3 - Esquema reacional de uma reação de guanilação.¹⁷

Reagentes guanilantes são normalmente carbodiimidas, ácidos sulfônicos, tioureias, isotioureias e carboximidamida-1-pirazole (figura 5).¹⁶⁻¹⁷



R = Corresponde a grupos protetores, geralmente Boc ou Cbz.

Figura 5 - Reagentes guanilantes mais comuns.¹⁷

Avanços significativos na síntese de guanidinas revelou que o uso de reagentes guanilantes protegidos, normalmente com o *tert*-butoxicarbonil (Boc) ou o benziloxicarbonil (Cbz), em vez do uso da guanidina livre conduz a rendimentos mais elevados, facilitando também os procedimentos experimentais, uma vez que o uso destes grupos protetores torna as guanidinas menos polares, assim como menos básicas.¹⁷

I.6 Aminas

As aminas são compostos básicos nucleofílicos. Estas características devem-se ao par de elétrons não partilhado pertencente ao átomo de azoto. Contudo, e se presente numa molécula com diversas funcionalidades, é necessário, para conseguir que outro grupo funcional presente na molécula reaja, inibir estas características. Uma das formas de o fazer é proteger as aminas convertendo-as em compostos em que o par de elétrons do azoto esteja envolvido numa ligação química.⁸

I.6.1 Proteção e desproteção de aminas

A conversão de aminas em amidas, como grupo protetor, pode ser, à *priori*, uma boa solução, contudo, a sua hidrólise deve ser realizada em condições de alta basicidade ou acidez, assim como temperaturas elevadas, o que pode afetar outros grupos funcionais, presentes na molécula. Estão reportados na literatura mais de 300 grupos protetores de aminas, contudo não chegam a 30, os grupos protetores de aminas que são frequentemente utilizados.¹⁸

Os carbamatos representam a família mais importante de grupo protetores de aminas. Todos os membros desta família são de fácil introdução através da reação entre o grupo amina com cloroformatos ou derivados de ácidos carboxílicos. Dos inúmeros grupos protetores que fazem parte desta família, os mais comuns são o *terc*-butoxicarbonil (Boc), o benziloxicarbonil (Cbz), o 9-fluorenilmetoxicarbonil (Fmoc) e o 2,2,2-tricloroetoxicarbonil (Troc) (figura 6).¹⁸

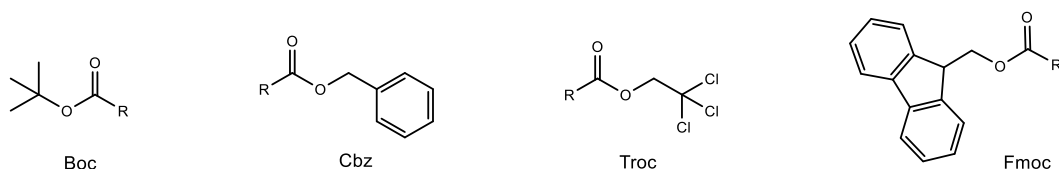
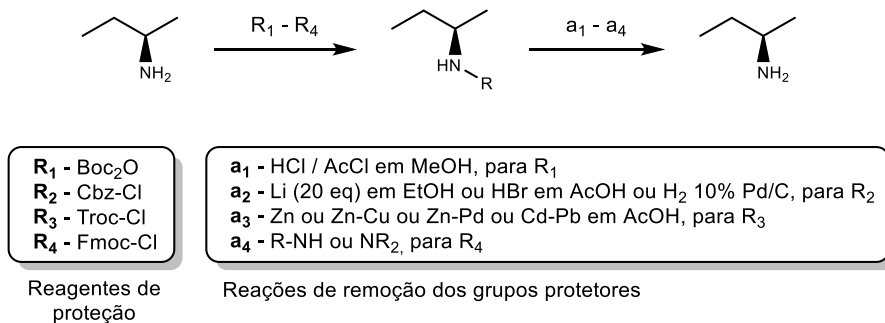


Figura 6 - Estrutura química dos grupos protetores de aminas, relevantes para o estudo atual.

Os grupos protetores referidos podem ser divididos em dois grupos consoante a sensibilidade química que apresentam. Grupos protetores como o Boc, o Cbz e o Troc são bastante resistentes a meio básicos e rapidamente hidrolisam em meios ácidos. O grupo protetor Fmoc apresenta sensibilidade inversa, é resistente em meio ácido e facilmente sofre hidrólise básica. Os grupos Cbz e Troc são ainda removidos em condições redutivas envolvendo metais, tais como Pd ou Zn.¹⁸⁻¹⁹



Esquema 4 – Demonstração geral de alguns grupos de proteção de aminas e as condições reacionais mais comuns de desproteção.¹⁸⁻¹⁹

Estão descritos na literatura vários métodos para a remoção de qualquer um dos grupos protetores mencionados. O grupo protetor Boc (**R₁**), pode ser removido, quimiosseletivamente, através de condições suaves de acidez (**a₁**).¹⁸⁻¹⁹ O Cbz (**R₂**) pode ser removido por hidrólise ácida ou hidrogenólise através dos seguintes métodos: hidrogenação catalítica (**a₂**). Para os grupos protetores Boc e Cbz, as condições de remoção mencionadas são suaves o suficiente para não interferir com qualquer outro grupo protetor ou funcional que a molécula possa conter.¹⁸⁻¹⁹ A

remoção do grupo protetor Troc (**R₃**) envolve eliminação redutiva com pares metálicos como Zn-Cu, Zn-Pb e Cd-Pb em meio ácido (**a₃**).²⁰ O Fmoc (**R₄**) é o grupo protetor mais apropriado para proteger aminas em sínteses complexas, uma vez que este grupo protetor é excepcionalmente estável em condições ácidas, oxidativas e redutoras.^{18, 21} A remoção deste grupo protetor é realizada através de uma clivagem, não hidrolítica, básica, geralmente com uma amina simples (**a₄**), e a amina protegida é libertada sob a forma de base livre (esquema 4).¹⁹

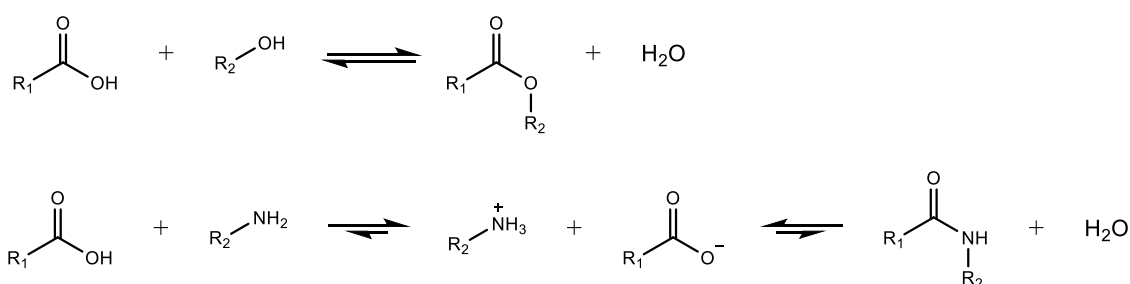
I.7 Amidas

A funcionalidade amida é bastante comum tanto em moléculas sintéticas como em produtos naturais. São fundamentais na vida, uma vez que as proteínas desempenham um papel crucial em quase todos os processos biológicos, como por exemplo, catálise enzimática, proteção imunológica, transporte, entre outros.²²

Na química medicinal, as amidas também desempenham um papel fundamental, onde o grupo funcional carboxamida aparece em cerca de 25% dos medicamentos mais conhecidos. A importância das amidas advém das suas características; estas são espécies neutras, estáveis e são em simultâneo um grupo aceitador e doador de eletrões.²²

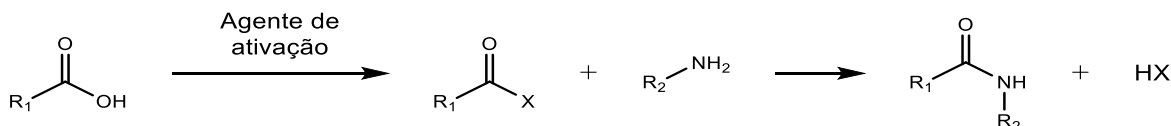
I.7.1 Síntese de amidas

A formação de uma ligação amida entre um ácido carboxílico e uma amina é uma reação de condensação. Esta pode ser comparada à formação de um éster entre um ácido carboxílico e um álcool, no entanto as reações de esterificação que, tão bem funcionam para a formação de ésteres, no caso das amidas conduzem a uma reação ácido-base que forma um sal estável e não à amida desejada (esquema 5).²²



Esquema 5 - Formação da ligação éster versus ligação amida.²²

Este inconveniente pode ser ultrapassado através da ativação do ácido carboxílico, ou seja, a conversão do grupo hidroxilo num bom grupo de saída, para que se possa dar o ataque pela amina (esquema 6). Os ácidos carboxílicos podem ser ativados a halogenetos de acilo, acilimidazóis, anidridos, ésteres, entre outros, ou através do uso de agentes de acoplamento.²²



Esquema 6 - Ativação do ácidos carboxílicos seguido de uma aminólise.²²

I.7.1.1 Reações entre ácidos carboxílicos e aminas

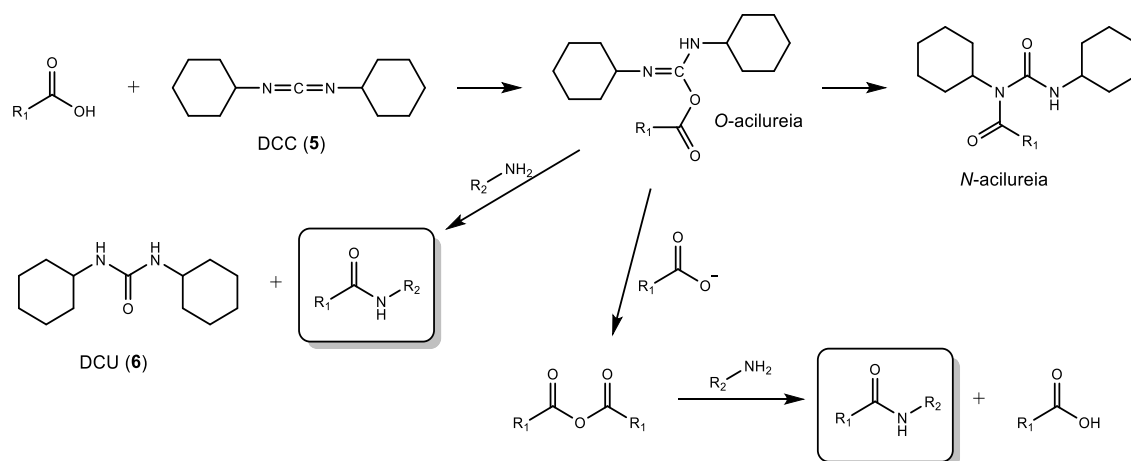
Como anteriormente mencionado, uma das formas de ativar um ácido carboxílico é através do uso de agentes de acoplamento.

Mais de cem reagentes de acoplamento estão reportados na literatura. Contudo nem todos são eficientes para a formação da ligação amida. As carbodiimidas foram os primeiros reagentes de acoplamento a serem sintetizados e constituem o método clássico de acoplamento. Desta família fazem parte a *N,N'*-diciclohexilcarbodiimida (DCC), a *N,N'*-diisopropilcarbodiimida (DIC), entre outros.²³

O mecanismo do agente de acoplamento DCC (esquema 7) envolve uma primeira reação entre este e o ácido carboxílico, que origina uma *O*-acilureia. Este intermediário pode conduzir a produtos diferentes:

- à amida desejada, por acoplamento direto com uma amina;
- a uma *N*-acilureia, um produto lateral desta reação;
- a um anidrido, que ao reagir com uma amina, origina a amida desejada.²³

Após a reação, os agentes de acoplamento podem ser removidos sob a forma de ureia, uma vez que esta não é solúvel em solventes orgânicos, e pode ser removida através de filtração. Contudo, para evitar a dimerização, este tipo de agentes de acoplamento são combinados com aditivos, como o 1-hidroxi-1H-benzotriazole e a *N*-hidroxisuccinimida (NHS).²³



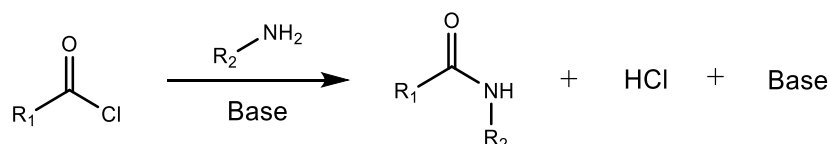
Esquema 7 - Acoplamento através do uso do agente de acoplamento DCC.²³

I.7.1.2 Reações entre cloretos de acilo e aminas

O grupo funcional cloreto de acilo é um reagente bastante comum em reações de síntese orgânica devido à sua elevada reatividade.⁸

A formação de cloretos de acilo é o método mais simples de ativar ácidos carboxílicos e, hoje em dia, vários cloretos de acilo estão disponíveis comercialmente.²²

A presença de dois átomos eletronegativos ligados ao mesmo átomo de carbono, o oxigênio e o cloro, que são eletroatratores, faz com que o átomo de carbono se torne eletrodeficiente; assim o átomo de carbono é facilmente atacado por um nucleófilo.⁸ A amida é formada através da reação entre o cloreto de acilo e a amina desejada, na presença de uma base, de forma a armadilhar o HCl formado e evitar a formação do sal da amina com a consequente diminuição de reatividade desta (esquema 8).²²

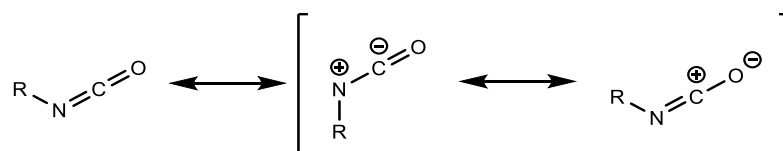


Esquema 8 - Esquema de reação de acilação de aminas com cloretos de acilo.²²

Contudo os cloretos de acilo apresentam algumas limitações, devido ao perigo de hidrólise, racemização, clivagem de um grupo protetor entre outras reações secundárias.²²

I.7.1.3 Reações entre isocianatos e reagentes de Grignard

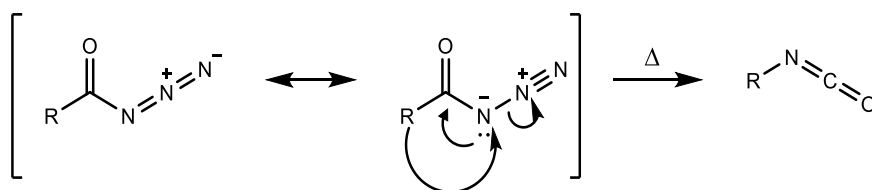
Isocianatos são compostos químicos que contêm a funcionalidade $\text{N}=\text{C}=\text{O}$ na sua estrutura. Estes compostos apresentam uma reatividade elevada, sendo por isso, bastante requeridos na síntese orgânica.



Esquema 9 - Estruturas de ressonância do isocianato.

Os isocianatos têm sido largamente utilizados em síntese orgânica desde a sua descoberta em 1848 por Wurtz, que os obteve ao fazer reagir sulfato de dietilo com cianeto de potássio.²⁴ Atualmente estão descritas na literatura inúmeras metodologias para sintetizar este grupo funcional, sendo o rearranjo de Curtius uma das metodologias mais utilizadas.²⁵

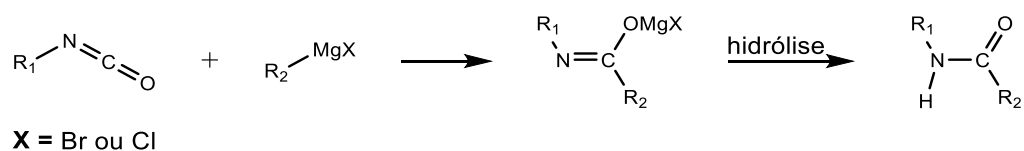
O rearranjo de Curtius foi reportado pela primeira vez em 1890 por Curtius e consiste na obtenção de isocianatos através da decomposição de acilazidas.²⁶ Este rearranjo é um processo concertado, em que a perda de azoto gasoso (N_2) e a migração do grupo R ocorrem ao mesmo tempo (esquema 10). Esta migração intramolecular ocorre com retenção total de configuração e é irreversível.²⁶



Esquema 10 - Mecanismo do rearranjo de Curtius

O intermediário isocianato pode ser isolado ou submetido diretamente a uma reação subsequente. Através de hidrólise pode originar uma amina primária; através de um ataque nucleófilo por álcoois, aminas ou organometálicos pode originar, respetivamente, carbamatos, acilureias ou amidas.²⁷ A alta reatividade do isocianato acoplada à nucleofilia presentes nos reagentes de Grignard torna esta reação possível.²⁸

O grupo isocianato apresenta dois grupos reativos (-N=C e -C=O), ao qual o reagente organometálico se pode ligar, no entanto, estudos demonstram, por comparação com isotiocianatos, grupo funcional bastante semelhante a isocianatos, que a adição se dá no grupo carbonilo (Esquema 11).²⁸



Esquema 11- Esquema de adição de organometálicos a isocianatos, seguido de hidrólise.²⁷

II. Discussão de Resultados

II.1 Preâmbulo

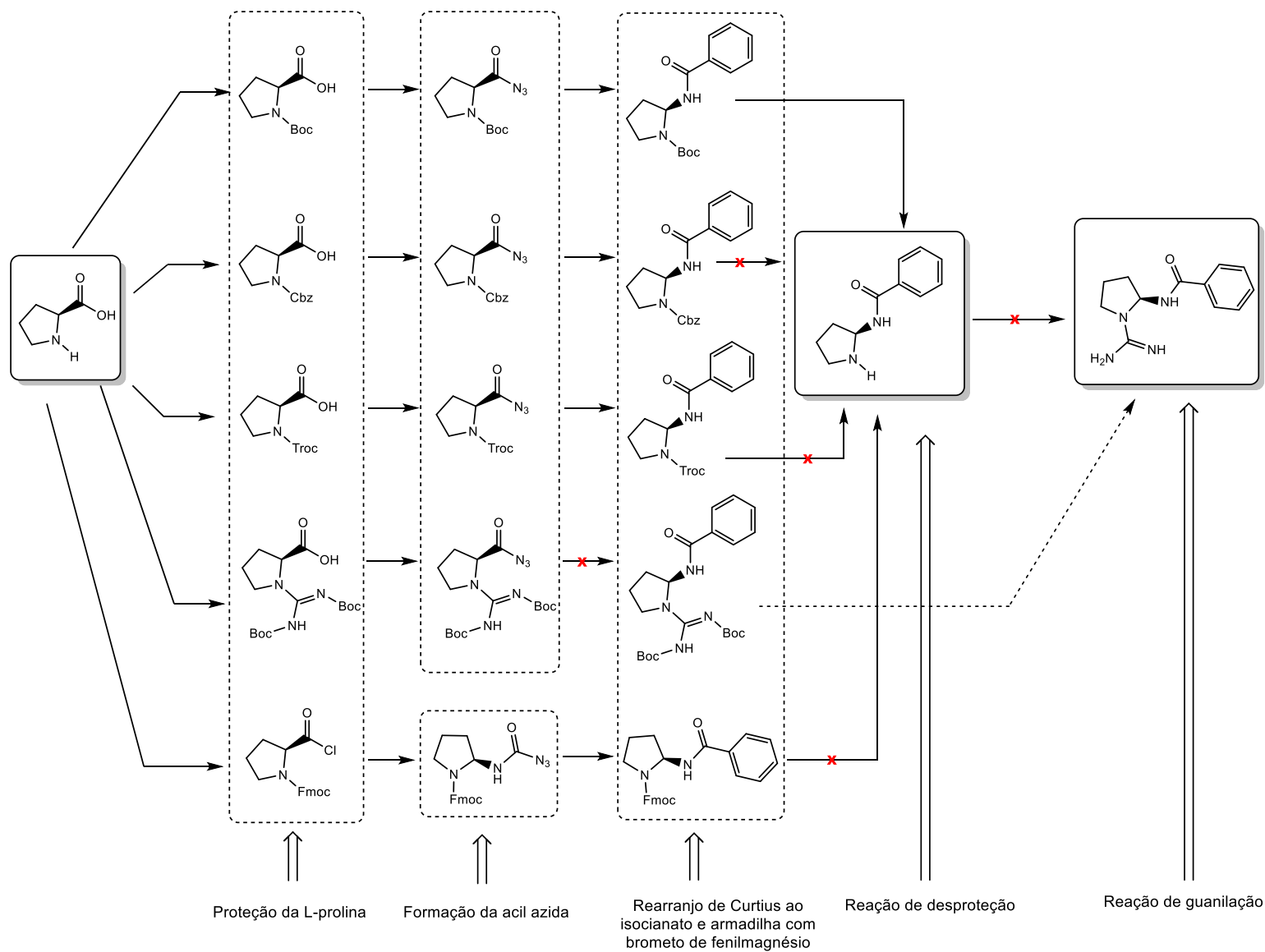
O trabalho desenvolvido nesta tese de mestrado vem dar continuidade a trabalhos de investigação decorridos no laboratório de investigação de química orgânica. O projeto visa a síntese do alcalóide Cernumidina e análogos, um promissor inibidor de IL-8 produzida por células cancerígenas HT-29 do cólon. Assim sendo, o principal objetivo desta tese de mestrado foi o desenvolvimento de uma metodologia para a síntese deste alcalóide. Foram realizadas duas abordagens sintéticas com materiais de partida distintos, a L-prolina (**2**) e a L-arginina (**3**).

A abordagem sintética que teve como material de partida a L-prolina envolveu a proteção inicial da funcionalidade amina com os grupos protetores *tert*-butoxicarbonil (Boc), benziloxicarbonil (Cbz), 2,2,2-tricloroetoxicarbonil (Troc) e 9-fluorenilmetoxicarbonil (Fmoc). Foi ainda explorada uma via sintética envolvendo a derivatização inicial da L-prolina a um derivado guanidina, através de um reagente guanilante.

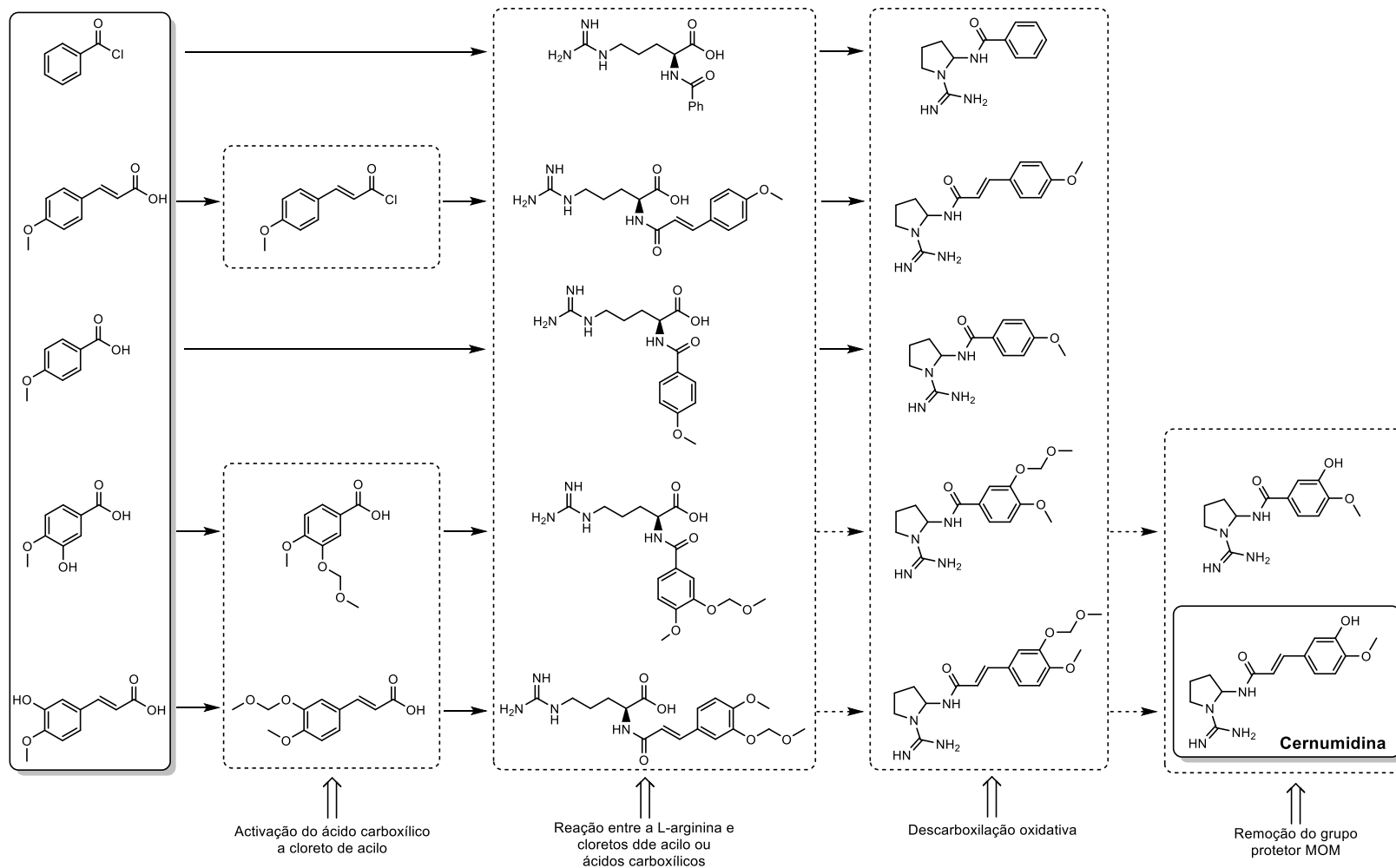
A via sintética envolvendo a L-prolina (**2**) como material de partida tem como passo chave o rearranjo de Curtius e a armadilha do intermediário isocianato com um reagente organometálico. Esta via envolvia em seguida (exceto no caso em que o reagente guanilante já se encontrava presente) a remoção dos grupos de proteção Boc, Cbz, Troc e Fmoc seguido de reação de guanilação da pirrolidina. Devido não só aos baixos rendimentos que estas vias apresentaram, como também à instabilidade associada ao anel de pirrolidina após remoção do grupo protetor, foi necessário alterar a estratégia de síntese e iniciar uma nova abordagem.

Recorreu-se à L-arginina (**3**) como material de partida, devido à presença do grupo funcional guanidina na sua estrutura. Esta metodologia inicia-se com a *N* α -derivatização da L-arginina, convertendo-a numa amida. O passo chave desta nova abordagem é a descarboxilação oxidativa do aminoácido, após a sua funcionalização seguida de ciclização intramolecular ao anel pirrolidina. Esta metodologia tem, no entanto, como consequência a formação de um racemato.

Mapa de reações para a metodologia envolvendo a L-prolina como material de partida



Mapa de reações para a metodologia envolvendo a L-Arginina como material de partida



II.2 Metodologia adotada partindo da L-prolina

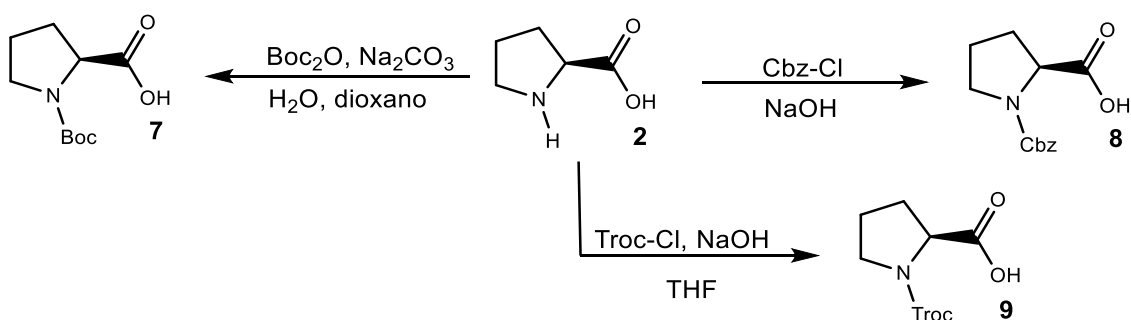
A L-prolina (**2**) foi considerada um bom material de partida, para a síntese do alcalóide **1**, uma vez que este aminoácido já contém na sua estrutura o centro assimétrico que a cernumidina possui. Este aminoácido apresenta no seu esqueleto um grupo amina. É necessário proteger este grupo funcional para que não participe em nenhuma das reações subsequentes, de modo a que não perca a sua funcionalidade uma vez que, um dos objetivos é transformar esta amina numa guanidina.

O primeiro passo desta estratégia sintética, tal como delineado no preâmbulo, é proteger a amina da L-prolina ou derivatizá-la à guanidina. De seguida o ácido carboxílico do aminoácido é transformado num grupo acil azida. Este é o substrato que vai permitir obter o isocianato, através do rearranjo de Curtius, que após armadilha com um reagente de Grignard, (neste trabalho foi usado o brometo de fenilmagnésio) deverá originar a amida pretendida. Por fim, remove-se o grupo protetor de aminas e procede-se a reações de guanilação. A necessidade de criar diferentes vias sintéticas conforme o grupo de proteção utilizado advém das diferentes propriedades que os substituintes apresentam na proteção da amina ou na *N*-derivatização à guanidina.

II.2.1 Reações de *N*-derivatização da L-prolina

II.2.1.1 Proteção do grupo amina

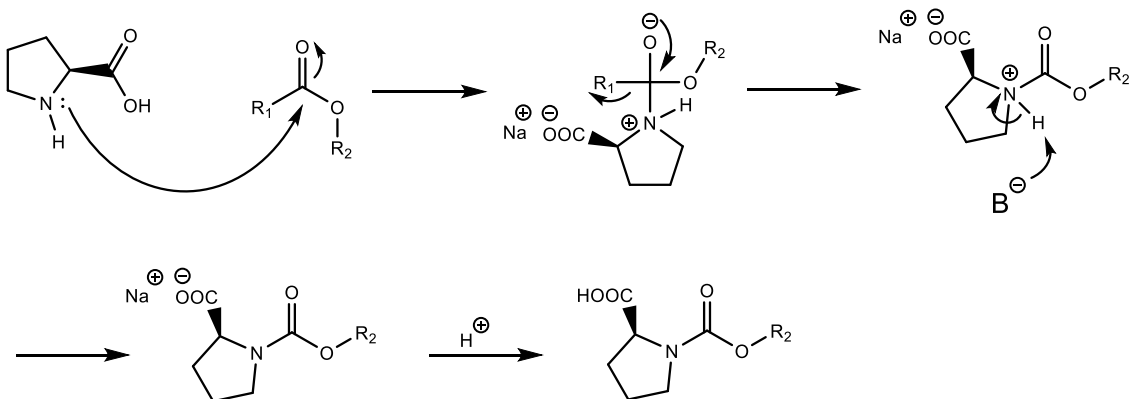
Atualmente existem vários compostos descritos na literatura capazes de proteger a funcionalidade amina, no presente estudo utilizou-se quatro carbamatos diferentes da L-prolina envolvendo os grupos de proteção, o *tert*-butoxicarbonilo (Boc), o benziloxicarbonilo (Cbz), o 2,2,2-tricloroetoxicarbonilo (Troc) e o 9-fluorenilmetoxicarbonilo (Fmoc). A Fmoc-prolina utilizada proveio de fonte comercial.



Esquema 12 - Proposta de síntese para os compostos *N*-*tert*-butiloxicarbonil-S-prolina (**7**), *N*-benziloxicarbonil-S-prolina (**8**) e ((2',2',2'-tricloroetoxi)carbonil)-S-prolina (**9**).

As três reações mencionadas no esquema 12, foram levadas a cabo em meios aquosos básicos e foram acompanhadas por c.c.f. e revelação com ninidrina e reagente de Dragendorff. A ninidrina é um revelador específico para aminoácidos sendo um bom revelador de aminas primárias e secundárias, tornando possível acompanhar o consumo da L-prolina. O reagente de Dragendorff é usado para revelar alcalóides, aminas básicas, compostos azotados e heterocíclicos. O uso deste revelador tornou possível observar a formação do produto, através do aparecimento de uma mancha menos polar que a mancha do material de partida.

O *work-up* da reação envolveu lavagens com éter etílico ou acetato de etilo com o objetivo de remover restos do grupo protetor que não tenha reagido, seguido de uma lavagem com solução ácida (1 M para as reações de inserção dos grupos Boc e Troc e 6 M para a reação de inserção do grupo Cbz) de modo a protonar o anião carboxilato formado e extrair o composto pretendido para uma fase orgânica.



Esquema 13 - Mecanismo geral de proteção da L-prolina com dicarbonato de di-*tert*-butilo (Boc_2O), cloroformiato de benzilo (Cbz-Cl) ou 2,2,2-tricloroetoxicarbonil (Troc-Cl).

O mecanismo de proteção da L-prolina, com qualquer um dos grupos protetores descritos envolve, no primeiro passo, um ataque nucleofílico por parte do átomo de azoto da L-prolina ao carbono do grupo carbonílico do grupo protetor. O passo seguinte reconstitui a ligação dupla carbono-oxigênio e elimina o cloreto, no caso do Cbz e do Troc, ou o *tert*-butanol e CO_2 no caso do Boc. Por fim a base, presente no meio, capta o hidrogênio do azoto, neutralizando também o ácido formado, dando origem aos compostos *N-tert*-butoxicarbonil-S-prolina (*N*-Boc-prolina, **7**), *N*-benzoilcarbonil-S-prolina (*N*-Cbz-prolina, **8**) e 2',2',2'-tricloroetoxicarbonil-S-prolina (*N*-Troc-prolina, **9**) (esquema 13).

A obtenção dos compostos *N*-Boc-prolina (**7**), *N*-Cbz-prolina (**8**) e *N*-Troc-prolina (**9**) foi confirmada por IV e por ^1H -RMN em CDCl_3 .

Em cada um dos espectros de ^1H -RMN foi possível, devido à complexidade apresentada, observar a presença de rotâmeros (figura 7). Este fenómeno deve-se ao facto da ligação entre o azoto da L-prolina e o carbamato do grupo protetor ter carácter rotacional. Este fenómeno faz com que o mesmo núcleo seja detetado duas vezes em ambientes químicos diferentes.

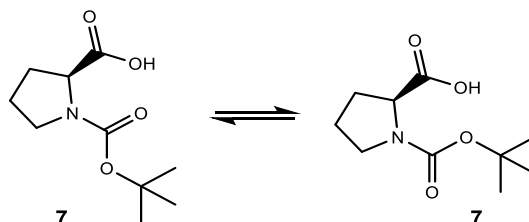


Figura 7 - Representação da rotação intramolecular do composto **7**; este fenómeno também é visível nos compostos **8** e **9**.

O composto **7** (*N*-Boc-prolina) foi obtido com um rendimento de 70,95%.

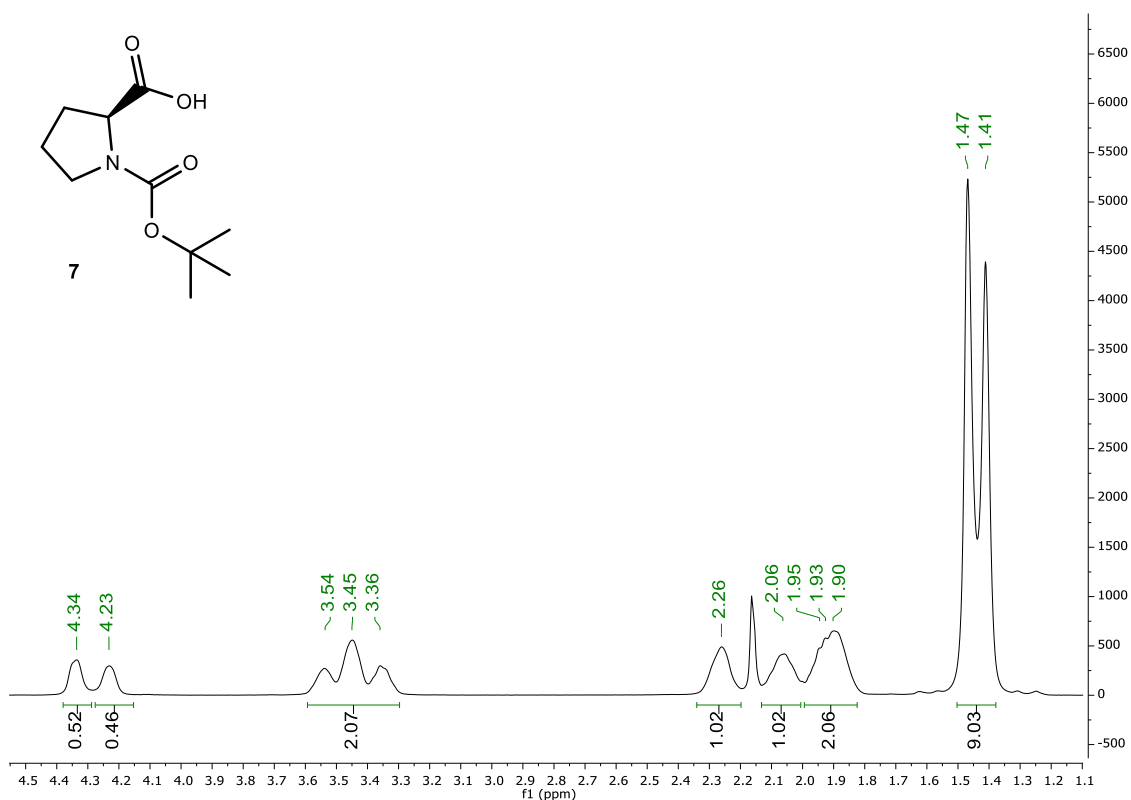


Figura 8 - Espectro de ^1H -RMN do composto *N*-terc-butiloxicarbonil-S-prolina (**7**) realizado em CDCl_3 .

A análise do espectro de ^1H -RMN, confirma a inserção do grupo protetor Boc, através de dois singletos a campo alto, a δ 1,47 e 1,41 ppm, com integração para nove prótons no total, respeitantes aos três grupos metilo que o grupo protetor Boc contém. Os restantes sinais encontram-se de acordo com o esperado (figura 8).

A análise do espectro de IV do composto **7** confirmou a presença de dois grupos carbonilos através da banda a 1739 cm^{-1} correspondente à vibração $\text{C}=\text{O}$ do carbamato presente no grupo protetor e da banda a 1638 cm^{-1} correspondente à vibração $\text{C}=\text{O}$ do ácido carboxílico. Outras bandas características da molécula também estão presentes, como é o caso das bandas a 2989, 2976 e 2896 cm^{-1} correspondentes aos alongamentos das ligações $\text{C}_{\text{sp}^3}\text{-H}$, da cadeia alifática; e a banda larga de $3200\text{ a }2536\text{ cm}^{-1}$ bastante característica do grupo hidroxilo de ácidos carboxílicos.

O composto **8** (*N*-Cbz-prolina) foi obtido num rendimento de 86,30%. A análise do espectro de ^1H -RMN confirma que a inserção do grupo Cbz na L-prolina foi bem sucedida através da presença do multipletto a campo baixo, entre δ 7,42 e 7,28 ppm com integração para cinco prótons, que confirma a presença do anel aromático na estrutura da molécula obtida (figura 9).

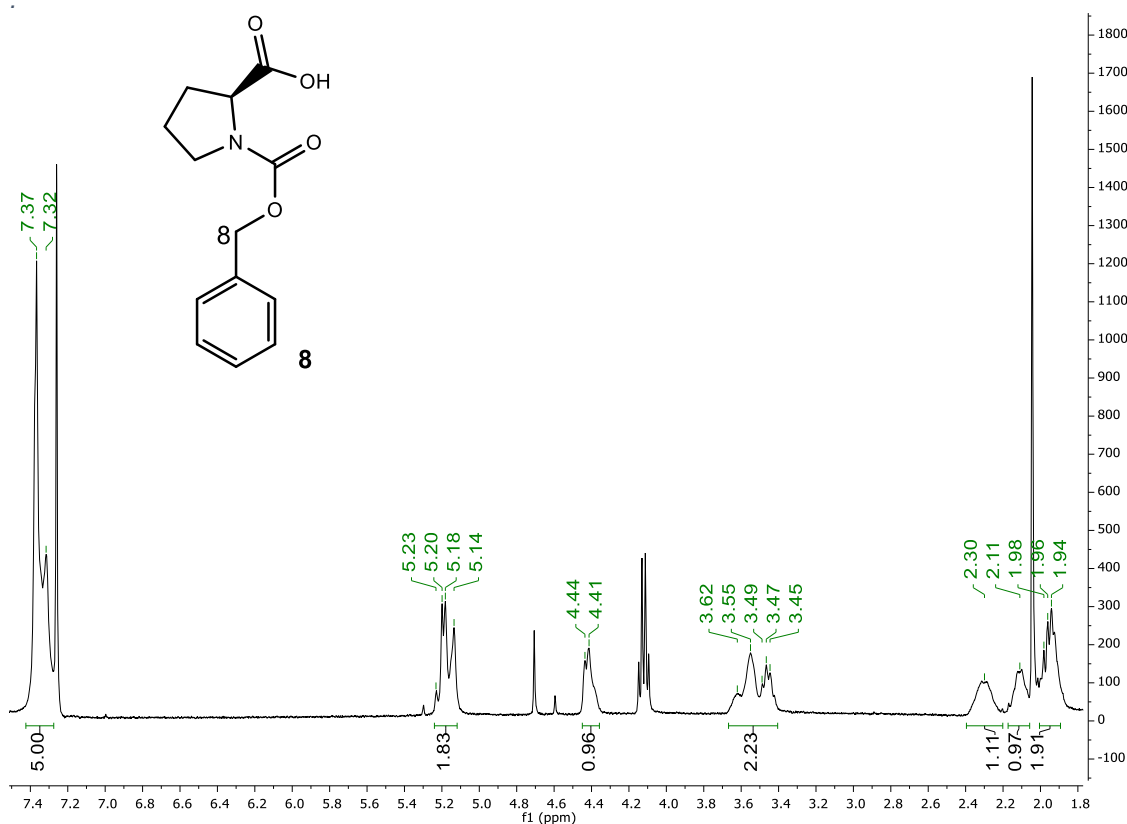


Figura 9 - Espectro de ^1H -RMN do composto *N*-benzoxicarbonil-*S*-prolina (**8**) realizado em CDCl_3 .

Para além de todos os sinais correspondentes ao esqueleto da L-prolina é ainda possível observar um multiplete de δ 5,23 a 5,14 ppm, com integração para dois prótons correspondentes aos prótons metilénicos do átomo de carbono adjacente ao anel (**C-8**, figura 9).

No espectro de IV, do composto **8**, esperava-se observar duas bandas intensas na região entre 1700 e 1600 cm^{-1} respeitantes aos dois grupos carbonilo presentes na molécula. Contudo, nessa região observa-se apenas uma banda, bastante intensa a 1681 cm^{-1} correspondente aos dois carbonilos. A junção das duas bandas pode ser devida à frequência de vibração de ambos os grupos carbonilo ser bastante próxima. Para além das bandas correspondentes ao alongamento das ligações $\text{C}_{\text{sp}^3}\text{-H}$ da molécula a 2982, 2959 e 2886 cm^{-1} e da banda O-H do ácido carboxílico de 3250 a 2886 cm^{-1} é possível observar duas bandas características do anel aromático. Especificamente a banda a 3033 cm^{-1} correspondente ao alongamento das ligações $\text{C}_{\text{sp}^2}\text{-H}$ do anel aromático e a banda forte a 1427 cm^{-1} correspondente às vibrações $\text{C}=\text{C}$.

A obtenção do composto **9** (*N*-Troc-prolina) deu-se com rendimento de 54,54%. A inserção do grupo protetor Troc na L-prolina foi confirmada por ^1H -RMN, através do multiplete entre δ 4,88 e 4,63 ppm, com integração para dois prótons, correspondente aos dois prótons metilénicos do átomo de carbono 1' (figura 10).

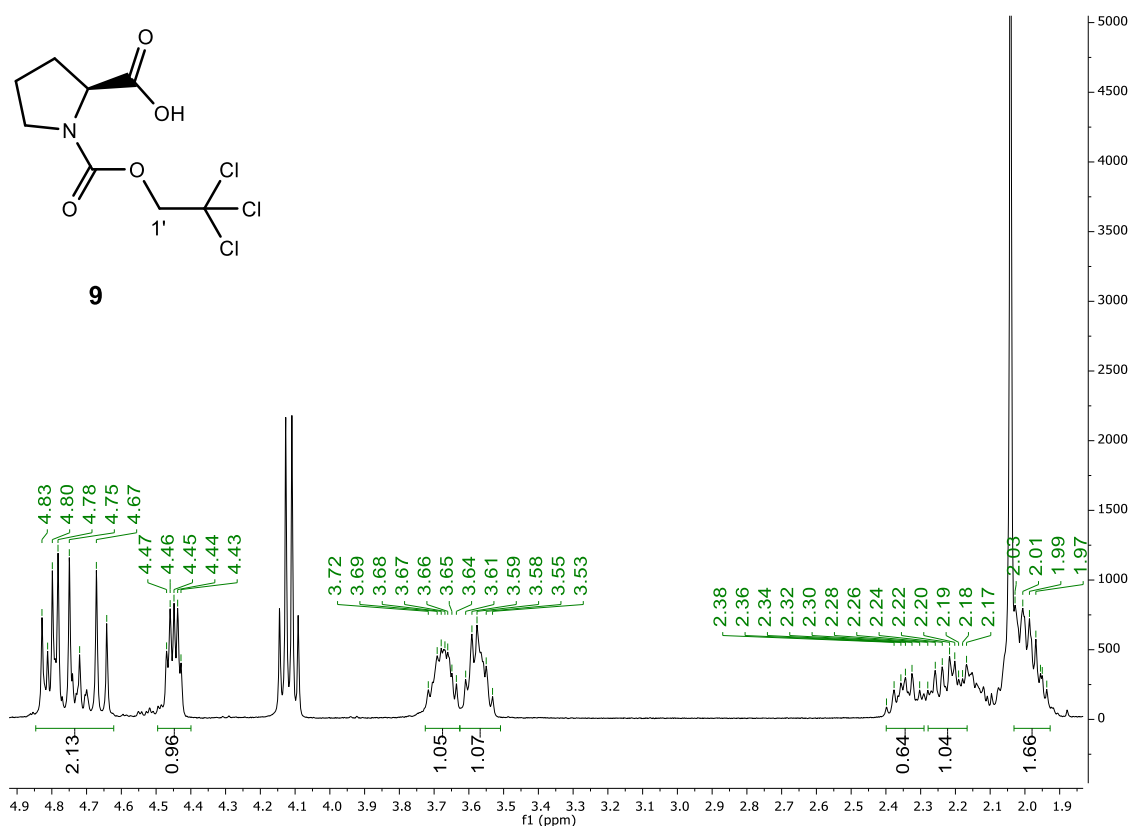


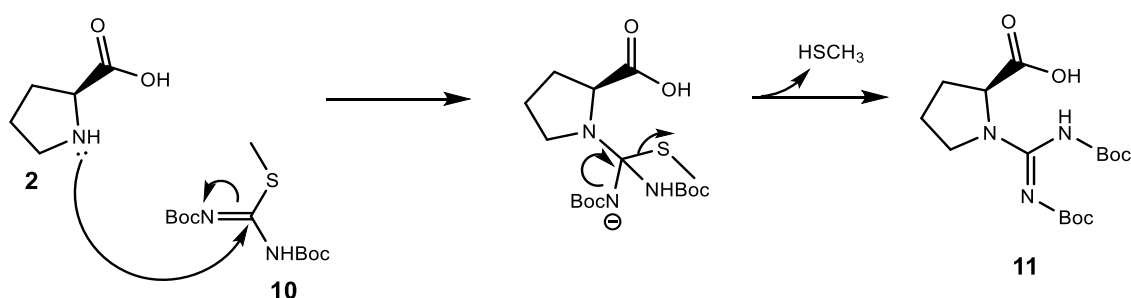
Figura 10 - Espectro de ^1H RMN do composto 2',2',2'-tricloetoxicarbonil-S-prolina (**9**), realizado em CDCl_3 .

No espectro de IV é possível observar apenas uma banda bastante intensa, a 1720 cm^{-1} respeitante aos dois carbonilos presentes na estrutura da molécula, nomeadamente, ao carbonilo do ácido carboxílico e ao carbonilo do carbamato. Tal como no composto **8**, pressupõe-se que a junção das duas bandas pode estar relacionada com a semelhança das frequências de vibração dos dois grupos carbonilo. A 2959 e 2889 cm^{-1} observam-se duas bandas, correspondentes a alongamentos das ligações alifáticas presentes na estrutura da molécula, é ainda possível corresponder a banda larga entre 3600 e 2900 cm^{-1} ao grupo hidroxilo, do ácido carboxílico.

II.2.1.2 Inserção do grupo carbodiimida

A inserção direta do grupo carbodiimida na amina da L-prolina permite converter a funcionalidade amina, da L-prolina, numa guanidina protegida e de seguida funcionalizar o grupo ácido carboxílico da L-prolina.

A reação de guanilação decorreu em meio básico (tal como efetuado para a proteção com o grupo Boc) numa mistura de 2:1 de 1,4-dioxano e água como solvente, e teve como reagente guanilante o composto 1,3-di-(*tert*-butiloxicarbonil)-2-metil-tiopseudoureia (**10**). A reação foi acompanhada por c.c.f. e usou-se como reveladores a ninidrina e reagente de Dragendoff, onde se observou o aparecimento de duas manchas novas. A reação é bastante lenta tendo-se prolongado por quatro dias. O *work-up* desta reação envolveu a extração de reagente guanilante que não tenha reagido com acetato de etilo, seguido de uma lavagem com solução ácida para protonar o anião carboxilato, de modo a que o composto *N,N*-di-(*tert*-butiloxicarbonil)carbamimidoil-S-prolina (*N*-Boc-carbamoil-prolina) (**11**) seja extraído para a fase orgânica.



Esquema 14 – Mecanismo da reação de guanilação para preparação do composto **11**.

O primeiro passo do mecanismo de guanilação é o ataque nucleofílico por parte do átomo de azoto da L-prolina ao átomo de carbono central do reagente guanilante, forçando assim o deslocamento do par de eletrões da ligação dupla para o átomo de azoto. A reconstituição da

ligação dupla carbono-azoto elimina metanotiol gasoso e dá origem ao composto *N*-Boc-carbamoil-prolina (**11**) (esquema 14).

Obteve-se o composto **11** (*N*-Boc-carbamoil-prolina) com rendimento de 10,83% e a sua obtenção foi confirmada através de IV e por ^1H -RMN em $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$.

Uma vez que por c.c.f. se verificou o consumo completo do material de partida, o rendimento baixo pode estar relacionado com o *work-up* da reação. O passo da acidificação pode ter sido demasiado drástico e ter removido os grupos protetores Boc da guanidina e ter protonado o composto, impedido que este seja extraído para a fase orgânica.

No espectro de IV verifica-se a presença de uma banda intensa, a 1717 cm^{-1} respeitante aos grupos carbonilo presentes na estrutura da molécula; na zona dos alifáticos existem duas bandas, a 2982 cm^{-1} e 2934 cm^{-1} , respeitantes aos alongamentos das ligações $\text{C}_{\text{sp}^3}\text{-H}$. Verifica-se também a presença de uma banda larga entre 3500 cm^{-1} e 2850 cm^{-1} característica do grupo hidroxilo do ácido carboxílico presente na molécula.

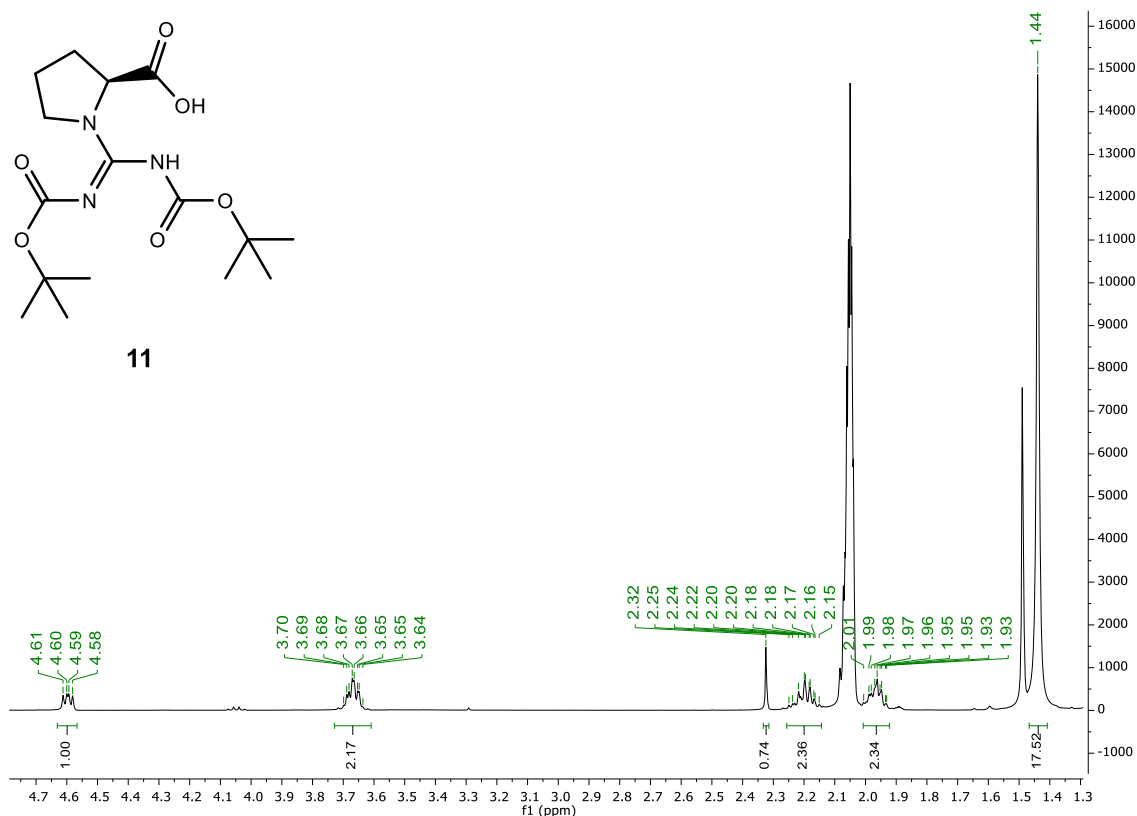


Figura 11 - Espectro de ^1H -RMN do composto *N,N'*-di-(tert-butiloxycarbonyl)carbamimidoil-S-prolina (**11**), realizado em $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$.

O espectro de ^1H -RMN tem evidência da inserção do grupo carbodiimina através da presença de um singuleto a campo alto, a δ 1,44 ppm, com integração para 18 prótons, correspondentes aos prótons dos dois grupos *terc*-butilo, que protegem as aminas da guanidina (figura 11). Também característico deste composto é o duplo duplete a δ 4.6 ppm correspondente ao próton α ao grupo carboxílico. Os dados obtidos são ligeiramente diferentes dos observados por Drake e Patel, contudo os espectros foram realizados em solventes diferentes.²⁹ Os valores obtidos estão, no entanto, de acordo com os observados num trabalho anterior, realizado no laboratório, e confirmados por espectrometria de massa de alta resolução.³⁰

II.2.2 Síntese de acilazidas

Após a proteção da funcionalidade amina da L-prolina procedeu-se à ativação do ácido carboxílico da estrutura. Esta ativação é necessária uma vez que o grupo hidroxilo é um mau grupo de saída. É necessário substituí-lo por um bom grupo de saída de modo a que seja possível realizar a reação seguinte, a formação da acilazida.

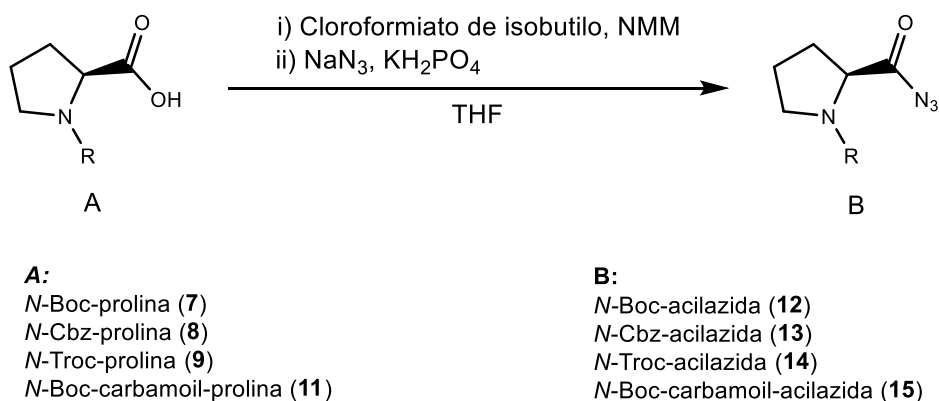
Estão descritos na literatura vários métodos para ativar o ácido carboxílico. Neste trabalho o ácido carboxílico foi ativado a anidrido misto, um intermediário na síntese, *one pot* de acilazidas. A escolha do anidrido misto como intermediário baseia-se em resultados de investigações anteriores do grupo.

Alternativamente, o ácido carboxílico foi transformado no cloreto de acilo, este foi isolado e de seguida foi colocado a reagir com a azida de sódio, com o objetivo de originar uma acilazida.

II.2.2.1 Envolvendo a formação de um anidrido misto

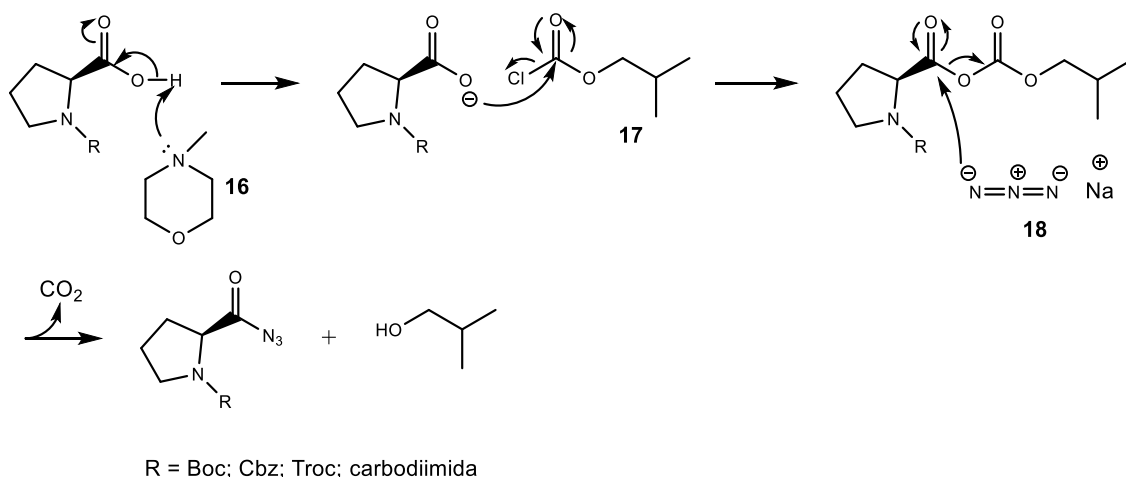
O anidrido misto foi conseguido através da reação entre a L-prolina *N*-derivatizada e o cloroformiato de isobutilo em THF, na presença de uma base, *N*-metil-morfolina. Numa segunda fase, adicionou-se ao meio reacional fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4) e de seguida a azida de sódio (esquema 15). A adição de KH_2PO_4 tem como objetivo manter o meio reacional a pH 7.

A reação foi monitorizada por c.c.f. e revelação com reagente Dragendorff, onde foi possível acompanhar o desaparecimento da mancha respeitante ao material de partida e o aparecimento de uma nova mancha menos polar. O *work-up* da reação envolveu a evaporação do solvente orgânico e de seguida adição de acetato de etilo. Procedeu-se a lavagens com água destilada, solução tampão $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ pH 7 para remover o excesso de KH_2PO_4 e por fim *brine*.



Esquema 15 - Metodologia adotada para a síntese dos compostos *tert*-butil-carboxilato 2-*S*-azidocarbonil pirrolidina (**12**), (*S*)-2-(azidocarbonil)pirrolidina-1-carboxilato de benzilo (**13**), 2',2',2'-tricloroetil (*S*)-2-(azidocarbonil)pirrolidina-1-carboxilato (**14**) e *N,N*-di(*tert*-butoxicarbonil)carbamiimidoil-*L*-prolinol azida(**15**).

No mecanismo reacional, a *N*-metil-morfolina (NMO) (**16**) capta o próton do ácido carboxílico da *L*-prolina e o carboxilato formado ataca o carbonilo do cloroformiato de isobutilo (**17**). A recuperação da ligação dupla carbono-oxigênio elimina o cloreto e forma-se assim o anidrido misto e o hidrocloreto de NMO. De seguida a azida de sódio (**18**) ataca o átomo de carbono do carbonilo mais eletrofílico, liberta-se dióxido de carbono e isobutanol e formam-se as respectivas acilazidas (esquema 16).



Esquema 16 - Mecanismo geral para a síntese de acilazidas, envolvendo o anidrido misto.

Os compostos obtidos foram caracterizados por IV e por ^1H -RMN em CDCl_3 . Pela análise dos espectros de IV foi possível detetar duas bandas relevantes para a conclusão destes produtos. Todos os compostos obtidos apresentam uma banda muito intensa entre 2142 e 2138

cm⁻¹ respeitante ao grupo azida, contudo, três dos compostos obtidos (**12**, **13**, **14**) também apresentam uma banda entre 2250 e 2246 cm⁻¹ característica do grupo isocianato. A presença da banda a cerca de 2140 cm⁻¹ confirma a formação da acil azida, mas também a instabilidade deste grupo funcional à temperatura ambiente, uma vez que se começa a degradar originando o respetivo isocianato.

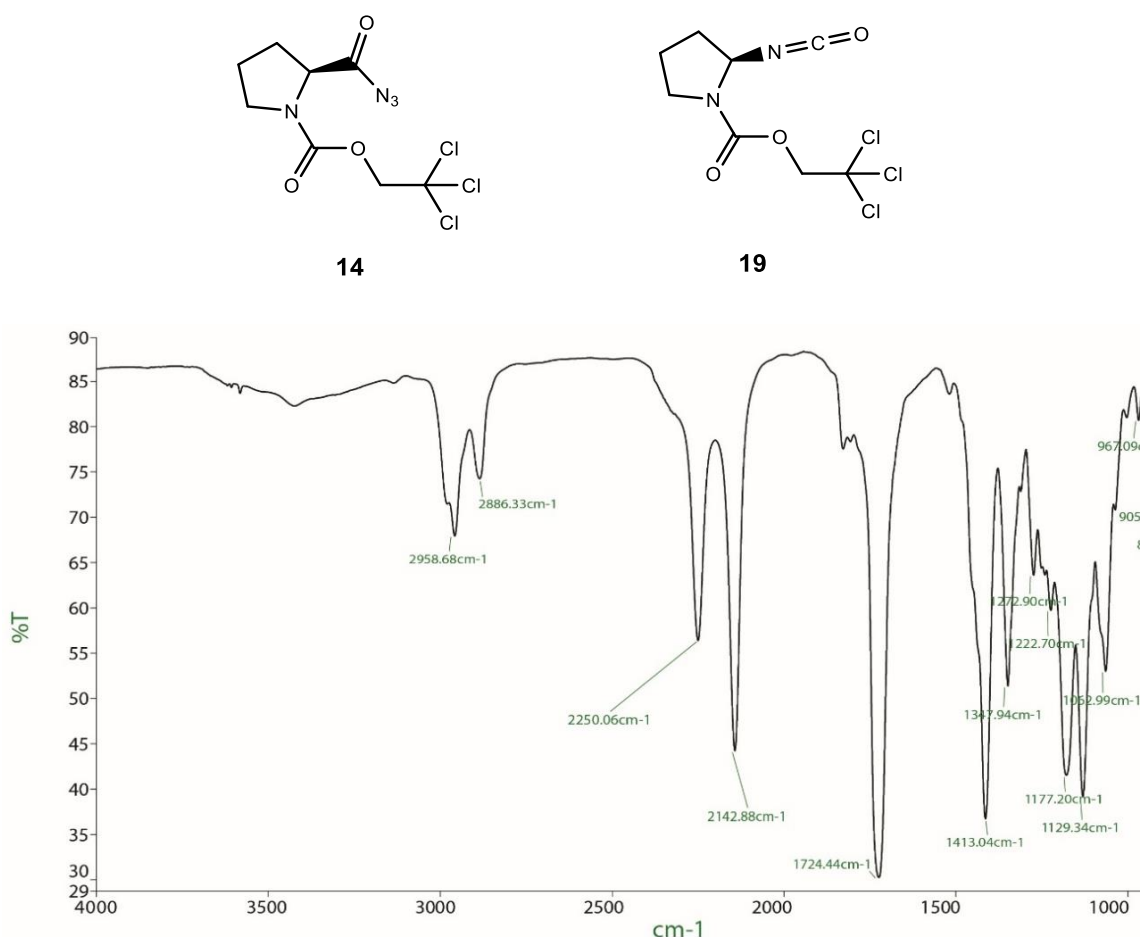


Figura 12 - Espectro de IV do composto **14**, com evidência da formação do respetivo isocianato (**19**) e representação das respetivas estruturas químicas.

No que diz respeito à análise dos espectros de ¹H-RMN a multiplicidade de sinais presentes também justifica a presença destas duas espécies. É possível identificar sinais característicos da presença do grupo funcional azida assim como do grupo funcional isocianato (figuras nos anexos 1 e 2).

Esta observação é apoiada por estudos efetuados em anos anteriores pelo grupo de investigação onde foram traçados espectros de ¹H-RMN 10 minutos, 4 horas e 24 horas depois da obtenção da *N*-Boc-acilazida; esta experiência demonstrou que com o tempo os dois

multipletos, aproximadamente a δ 4,30 ppm, diminuem de forma proporcional ao aparecimento do duplete a δ 5,5 ppm (figura 13), confirmando a decomposição da acilazida à temperatura ambiente.

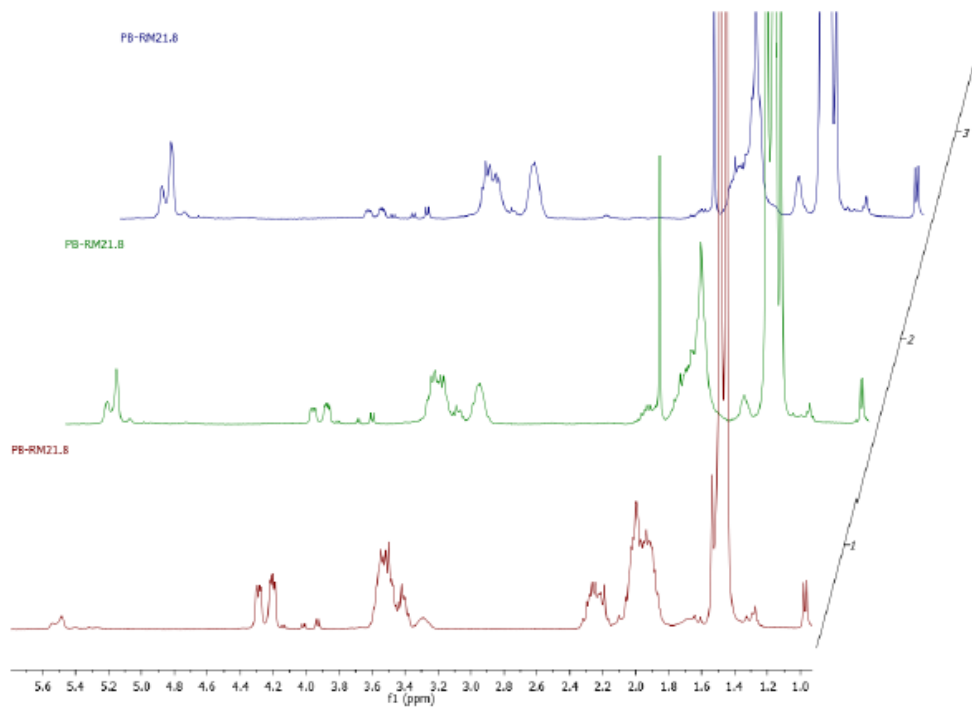
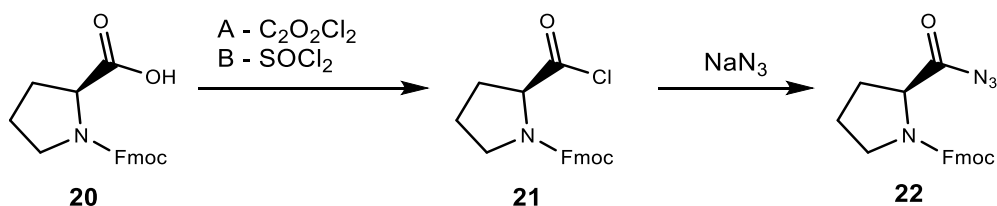


Figura 13 - Espectros de ¹H-RMN do composto (*N*-Boc-acilazida) efetuados em CDCl₃, 10 minutos (1), 4 horas (2) e 24 horas (3) após a sua obtenção.³⁰

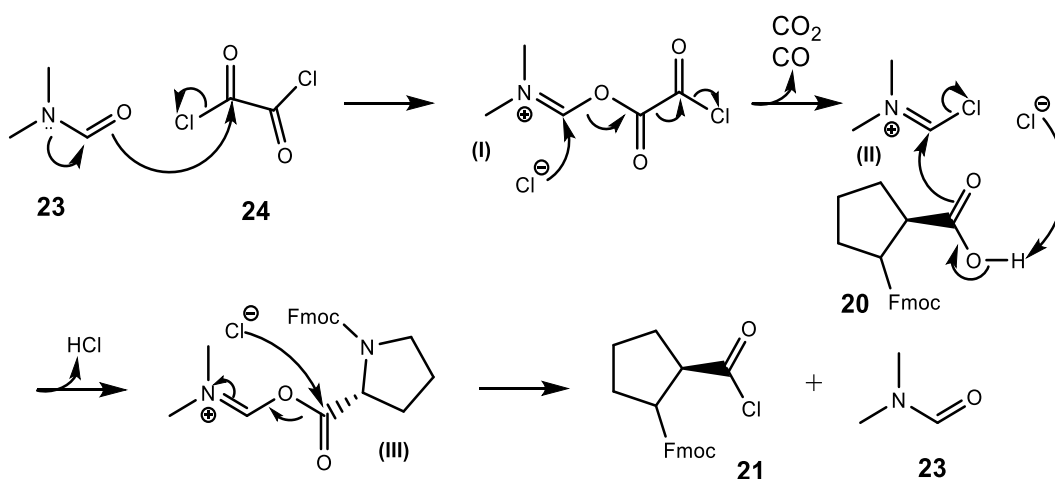
II.2.2.2 Envolvendo a formação de um cloreto de acilo

A preparação da acilazida, nas condições apresentadas no capítulo II.2.2.1, quando a prolina se encontra protegida com o grupo Fmoc não se apresenta como a via mais apropriada na medida em que este grupo pode não aguentar as condições reacionais básicas (a presença da NMO). A ativação do ácido carboxílico a cloreto de acilo foi uma opção proposta para a síntese de acilazidas (esquema 17).



Esquema 17 - Metodologias adotadas para a síntese de N-Fmoc-acilazida (**22**) a partir da N-Fmoc-prolina (**20**) através da preparação do cloreto de acilo, usando cloreto de oxalilo (método A) ou cloreto de tionilo (método B).

Numa primeira abordagem, a conversão do ácido carboxílico a cloreto de acilo foi realizada com cloreto de oxalilo na presença de dimetilformamida (DMF). O *work-up* da reação envolveu, apenas, a evaporação à pressão reduzida dos compostos voláteis formados na reação, assim como do solvente orgânico.



Esquema 18 - Mecanismo da formação do cloreto de acilo, a partir de um ácido carboxílico e de cloreto de oxalilo, na presença de DMF.

O mecanismo reacional deste método inicia-se com um ataque nucleofílico por parte do oxigênio do DMF (**23**) a um carbonilo do cloreto de oxalilo (**24**). A recuperação da dupla ligação carbono-oxigênio elimina um dos cloretos e origina o catião imínio (I). O cloreto, agora presente no meio reacional, ataca nucleofilicamente a dupla do catião imínio (I), dando origem ao intermediário (II) e eliminando CO_2 e CO no estado gasoso. A saída dos gases constitui a força motriz para a formação do intermediário (II). Numa segunda fase deste mecanismo a captação do próton do grupo hidroxilo da N-Fmoc-prolina (**20**), por parte do cloreto, forma o anião carboxilato que ataca a catião imínio (II) eliminando cloro. Por fim o cloreto ataca nucleofilicamente o carbonilo do catião imínio (III) e a reconstituição da ligação dupla carbono-

oxigênio dá origem ao composto 9-flourenilmetil (S)-2-(clorocarbonil)pirrolidina-1-carboxilato (**21**) e regenera o catalisador da reação, a DMF (**23**) (esquema 18).⁸

Através do método descrito foi possível obter o composto **21** com rendimento de 92,70%. A sua obtenção foi confirmada por IV e por ¹H-RMN em CDCl₃.

Foi possível confirmar a obtenção do composto **21** através da análise e comparação do espectro de IV deste com o espectro de IV do material de partida (composto **20**, N-Fmoc-prolina). A ausência da banda larga entre 3500 e 2000 cm⁻¹ característica do grupo hidroxilo, indica que a reação foi bem sucedida. Também é possível observar nas bandas correspondentes aos grupos carbonilo, 1702 e 1786 cm⁻¹, um ligeiro aumento de frequência, em comparação com as bandas a 1670 e 1742 cm⁻¹, visíveis no espectro do material de partida, que indica uma alteração num dos substituintes do carbono do carbonilo.

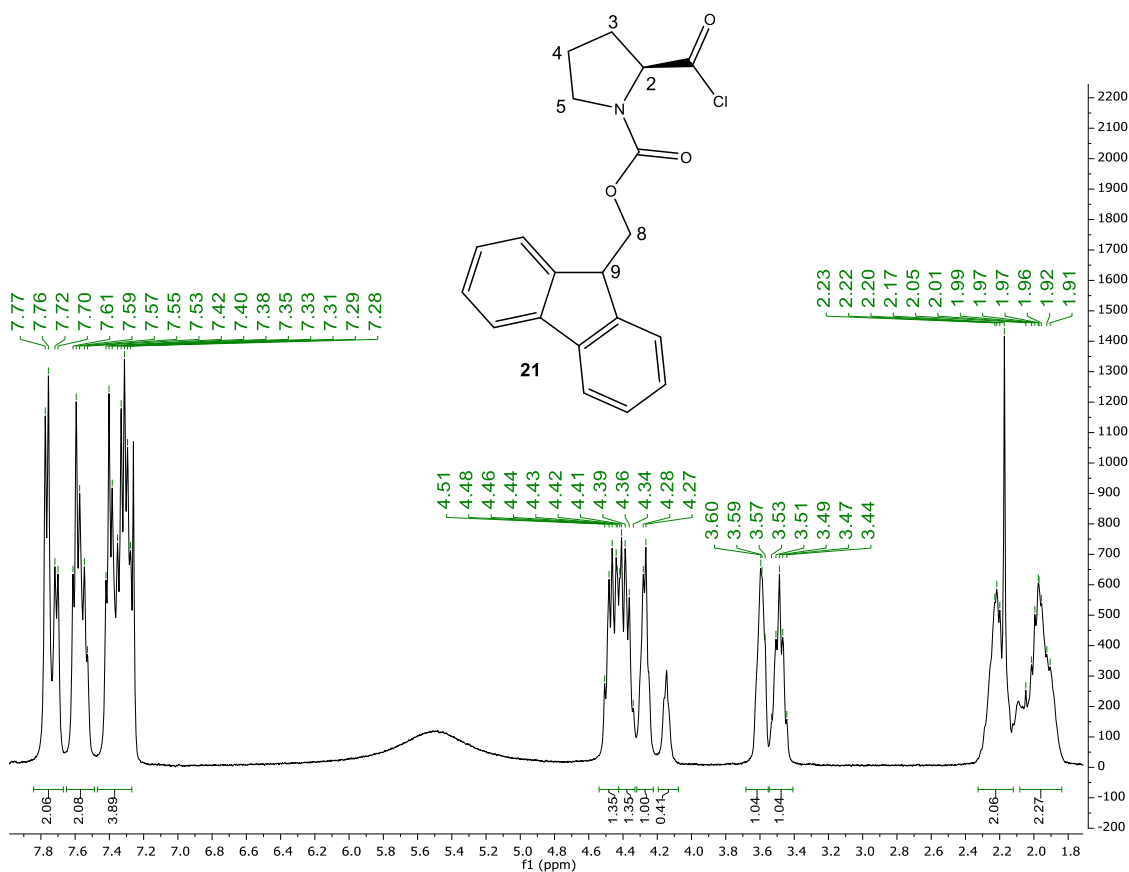


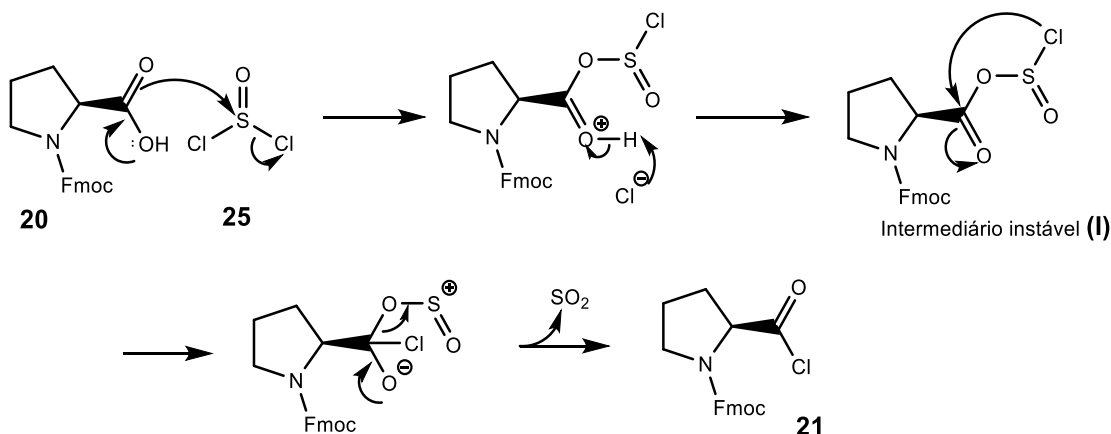
Figura 14 - Espectro de ¹H-RMN do composto **21**, obtido em CDCl₃ e respectiva representação da estrutura química.

A análise do espectro de ¹H-RMN confirma a estrutura do produto obtido. Os multipletos a campo baixo, entre δ 7,77 e 7,28 ppm, com integração total para oito prótons são respeitantes

aos prótons dos anéis aromáticos presentes no grupo protetor. É possível corresponder os três multipletos entre δ 4,51 e 4,1 ppm com integração total para três prótons, aos prótons dos átomos de carbonos 8 e 9. Quanto aos sinais respeitantes ao esqueleto da prolina também estão presentes no espectro de ^1H -RMN. O multipletto de δ 4,19 a 4,08 ppm, é característico do próton do átomo do carbono 2. Os dois multipletos entre δ 3,60 e 3,44 ppm, com integração total para dois prótons correspondem aos dois prótons do carbono 5. A campo alto, os dois multipletos de δ 2,23 a 2,17 ppm e δ 2,05 a 191 ppm, com integração total para quatro prótons, correspondem respetivamente aos dois prótons do átomo de carbono 3 e aos dois prótons do átomo de carbono 4 (figura 14).

Numa segunda abordagem a conversão do ácido carboxílico a cloreto de acilo foi realizada com cloreto de tionilo (**25**). Esta reação foi levada a cabo apenas com os dois reagentes, sem solvente. No final da reação levou-se o óleo obtido a evaporar a pressão reduzida de modo a remover os compostos voláteis formados.

Neste método o mecanismo envolve um ataque nucleofílico do oxigénio do anião carboxilato da *N*-Fmoc-prolina (**20**) ao átomo de enxofre do cloreto de tionilo (**25**), a recuperação da dupla ligação oxigénio-enxofre elimina o cloro, que sai na forma de HCl e dá origem ao intermediário instável (I). De seguida o carbono do carbonilo sofre um ataque intramolecular por parte do átomo de cloro, a reconstituição da ligação dupla oxigénio-carbono implica a eliminação de dióxido de enxofre e dá origem ao composto **21** (esquema 19).



Esquema 19 - Mecanismo da formação do cloreto de acilo, a partir de um ácido carboxílico e de cloreto de tionilo.

Através desta abordagem também foi possível obter o composto **21** com rendimento de 90,54%. A sua obtenção foi confirmada através de espectroscopia de IV. A comparação e a

semelhança visível entre os espectros obtidos em ambos os métodos, confirmam o produto formado (figura 15)

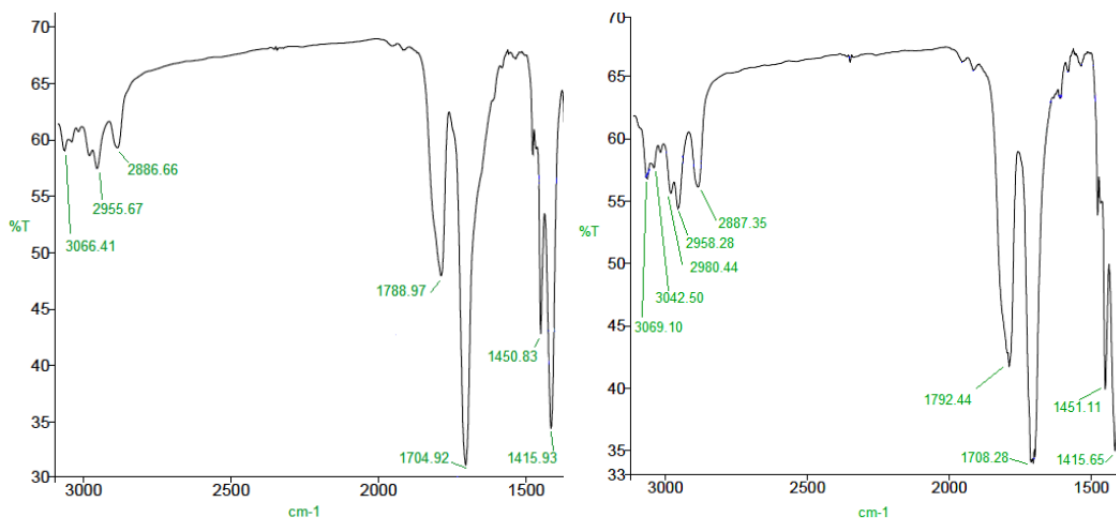
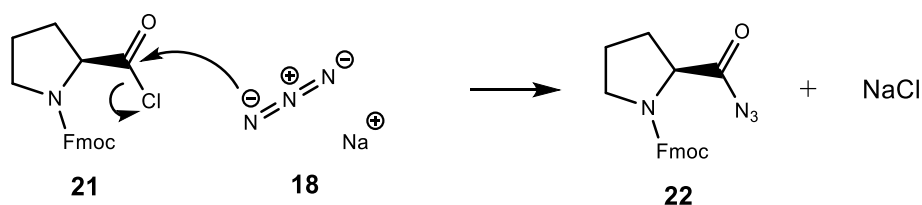


Figura 15 - Comparação dos espectros de IV obtidos para o composto **21**. **A**: ampliação do espectro de IV do composto **21** obtido através da reação entre a N-Fmoc-prolina e cloreto de oxalilo na presença de DMF; **B**: ampliação do espectro de IV do composto **21** obtido através da reação da N-Fmoc-prolina e cloreto de tionilo.

II.2.2.2.1. Formação de acilazidas

Após a ativação do ácido carboxílico a cloreto de acilo, este foi submetido a uma reação de substituição nucleofílica. A reação foi levada a cabo apenas na presença do composto **21** e azida de sódio (**18**) em acetona seca. O *work-up* envolveu a adição de água, seguida de várias extrações com acetato de etilo para retirar o composto, 9-fluorenilmetil (S)-2-(azidocarbonil)pirrolidina-1-carboxilato (**22**).

O mecanismo da reação envolve um ataque nucleofílico por parte de um dos átomos de azoto da azida e de seguida é restabelecida a ligação dupla carbono-oxigênio e dá-se a eliminação do cloro, formando assim o sal NaCl (esquema 20).



Esquema 20 - Mecanismo da reação entre cloretos de acilo e a azida de sódio, que dá origem ao composto 9-fluorenilmetil (S)-2-(azidocarbonil)pirrolidina-1-carboxilato (**22**).

Através deste método foi possível obter o composto **22** (*N*-fmoc-acilazida), com rendimento de 76,32%. A estrutura do composto obtido foi confirmada por IV e por ^1H -RMN em CDCl_3 .

Através da análise do espectro de IV, a presença de uma banda a 2142 cm^{-1} característica da azida, confirma a formação do composto esperado. No espectro de IV é ainda possível associar a banda a 1704 cm^{-1} aos dois grupos carbonilo presentes na estrutura da molécula. As bandas a 2918 e 2850 cm^{-1} são respeitantes aos alongamentos das ligações $\text{C}_{\text{sp}^3}\text{-H}$. As bandas 3066 cm^{-1} e 1451 cm^{-1} são características das vibrações dos sistemas aromáticos. Enquanto a banda a 3066 cm^{-1} é referente ao alongamento das ligações $\text{C}_{\text{sp}^2}\text{-H}$ de carbonos presentes em sistemas aromáticos, a banda a 1451 cm^{-1} é características das vibrações $\text{C}=\text{C}$.

Por ^1H -RMN verificou-se uma estrutura idêntica ao composto **21** e característica do sistema pirrolidina nestes compostos (figura 16).

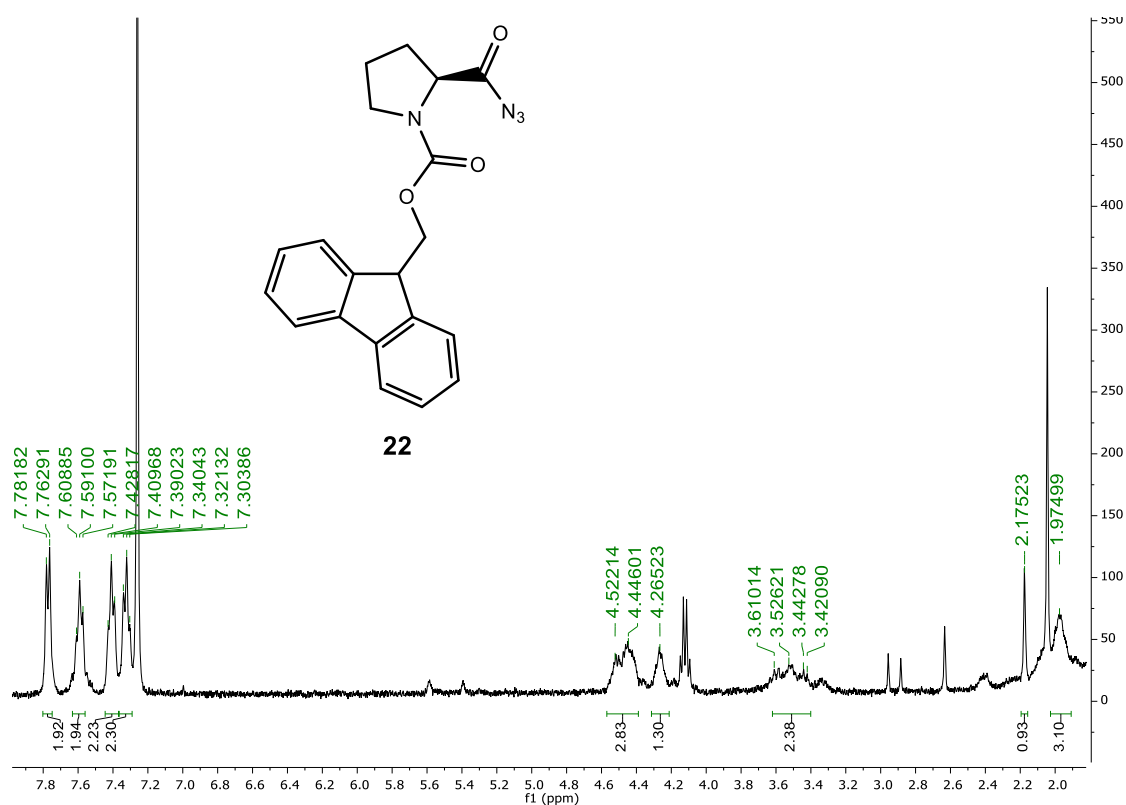


Figura 16 - Espectro de ^1H -RMN do composto **22**, realizado em CDCl_3 .

II.2.3 Síntese de carbamoil azidas

No estudo em questão foi possível sintetizar um composto com o grupo funcional carbamoil azida (figura 17) através da reação entre o composto **21** e dois equivalentes de azida de sódio.

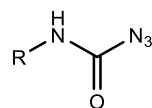
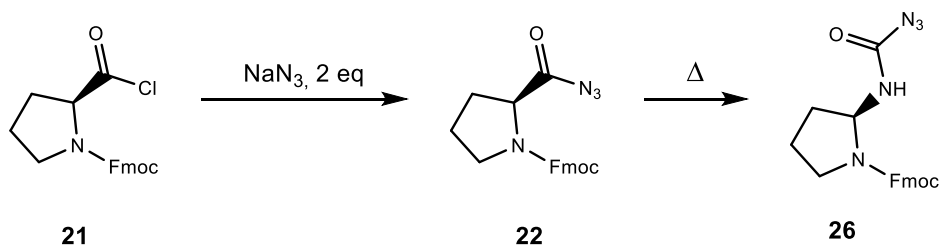


Figura 17 - Estrutura química do grupo funcional carbamoil azida.

Apesar de ser um intermediário útil em síntese orgânica, o uso destes compostos tem sido limitado devido à pressuposição inicial de que estes compostos são instáveis e de difícil síntese. As carbamoil azidas são, na sua maioria, instáveis, sensíveis ao calor, a meios ácidos e básicos e explosivas.

Os primeiros métodos para a síntese de carbamoil azidas descritos na literatura envolviam diazotização de semicarbazidas e compostos relacionados, tratamento de isocianatos com ácido hidrazóico e reações entre cloretos de carbamoilo com azidas de sódio. Todos os métodos apresentam inconvenientes como rendimentos baixos, uso de reagentes tóxicos e explosivos, como é o caso do ácido hidrazóico, e intermediários, isocianato e cloreto de carbamoilo, bastante instáveis em relação a ataques nucleofílicos.³¹ Atualmente já estão descritos na literatura novos métodos para a síntese deste grupo funcional como a degradação de aminas terciárias, ou, o mais utilizado, formação de acilazidas seguido de um rearranjo de Curtius e armadilha do isocianato com azidas. As mais recentes metodologias para a síntese de carbamoil azidas apresentam rendimentos elevados e o uso de reagentes menos perigosos, apesar das azidas e, como já referido, das próprias carbamoil azidas serem explosivas.³²



Esquema 21 - Metodologia adotada para a obtenção da N-Fmoc-carbamoilazida (**26**) a partir do composto **21**.

A reação entre o composto **21** e a azida de sódio, tal como visto no capítulo II.2.2, origina o composto **22**, este é submetido a aquecimento, e origina o isocianato correspondente, como há excesso de azida de sódio no meio reacional, dá-se um segundo ataque nucleofílico por parte da azida de sódio ao carbono do isocianato dando origem ao composto **26** (*N*-Fmoc-carbamoil azida).

O composto **26** foi obtido com rendimento de 95,94% e a sua caracterização foi realizada por espectroscopia de IV e por ^1H -RMN e ^{13}C -RMN em CDCl_3 e LC-MS.

Através da análise do espectro de IV, foi possível identificar dois grupos funcionais com bastante relevo para a conclusão do composto obtido. A existência de uma banda estreita e intensa a 2147 cm^{-1} , numa primeira análise remete para o grupo funcional azida, contudo esta tem uma frequência ligeiramente maior e ao associar este dado, à presença de uma banda a 3286 cm^{-1} característica de alongamentos N-H foi possível concluir a presença do grupo funcional carbamoilazida. No espectro de IV em questão também estão presentes outras bandas correspondentes a outras funcionalidades presentes na molécula. A 1703 cm^{-1} é possível observar uma banda intensa correspondentes aos dois grupos carbonilo presentes na estrutura do composto **26**; a banda 3064 cm^{-1} corresponde aos alongamentos $\text{C}_{\text{sp}2}\text{-H}$ e as bandas a 1446 e 1411 cm^{-1} correspondem às vibrações das ligações $\text{C}=\text{C}$. As bandas a 2958 e 2891 cm^{-1} são respeitantes aos alongamentos das ligações $\text{C}_{\text{sp}3}\text{-H}$.

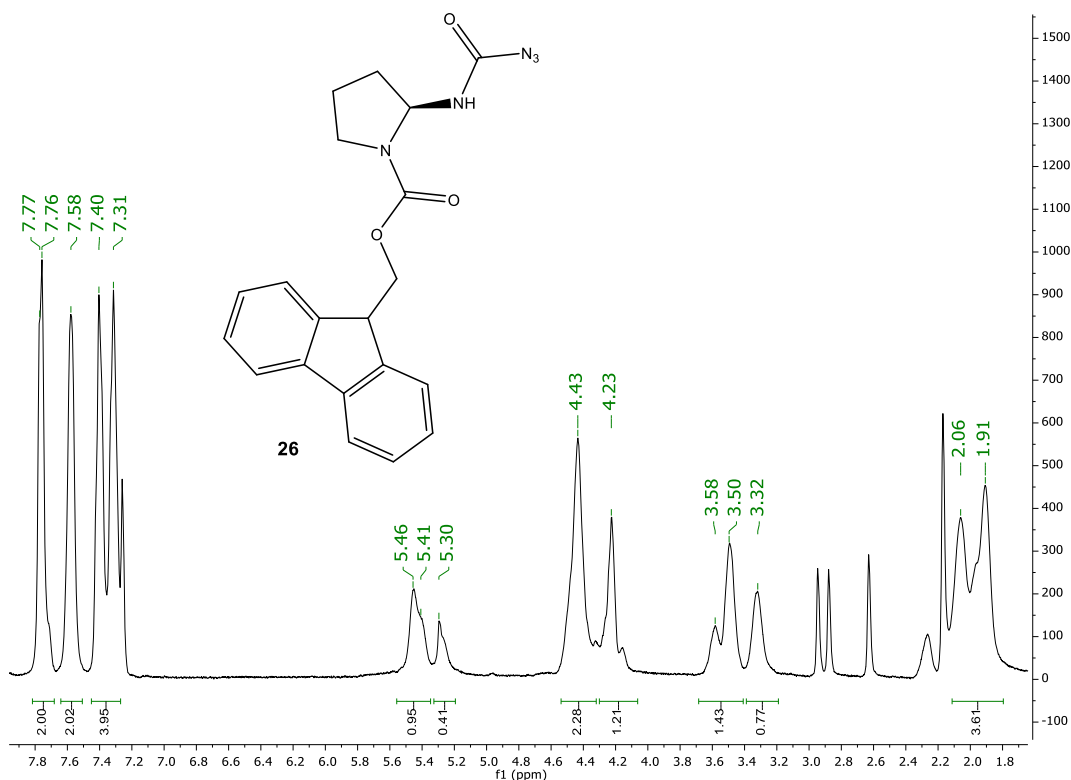


Figura 18 - Espectro de ^1H -RMN do composto **26** (*N*-Fmoc-carbamoil-azida), realizado em CDCl_3 .

Através da análise do espectro de ^1H -RMN é possível observar a presença de um singlete largo a δ 5,29 ppm, com integração para 0,45 prótons, respeitante ao próton da amida. Os restantes sinais visíveis no espectro de ^1H -RMN estão de acordo com o espectável para a estrutura do composto (figura 18).

No espectro de ^{13}C -RMN é possível observar os dois carbonos dos dois grupos carbonilo, presentes na molécula, a δ 162,87 e 154,62 ppm que correspondem, respetivamente, ao carbonilo da acil azida e ao carbonilo do carbamato. Os carbonos terciários, presentes no grupo protetor Fmoc, apresentam um desvio químico de δ 143,95 e 141,46 ppm e os restantes átomos de carbono aromáticos apresentam desvios químicos de δ 127,87 a 120,13 ppm. Os carbonos alifáticos apresentem sinais a campo alto (figura 19).

Apesar de não se terem traçado espectros bidimensionais para melhor corresponder os prótons aos respetivos átomos de carbono, esta atribuição foi realizada com base em espectros de ^{13}C -RMN do composto **20** (*N*-Fmoc-*L*-prolina) disponíveis na literatura.³³

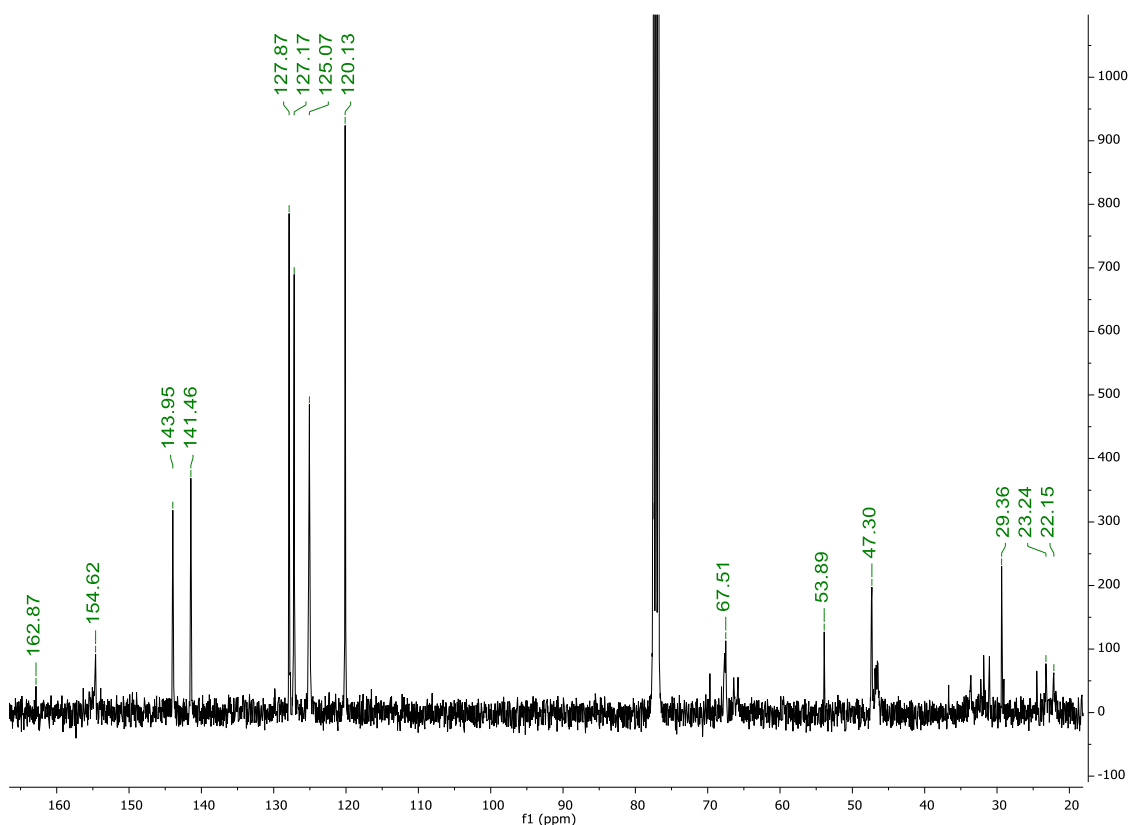


Figura 19 - espectro de ^{13}C -RMN do composto **26** (*N*-Fmoc-carbamoyl azida), realizado em CDCl_3 .

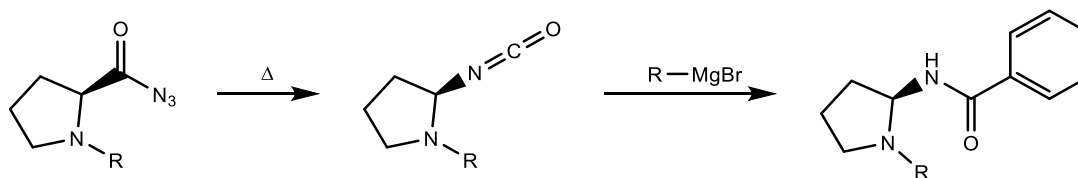
Na análise por LC-MS foi possível identificar o pico do ião molecular protonado a m/z 378 $[\text{M}+\text{H}]^+$ assim como um pico a m/z 777 correspondente ao aduto de sódio com o dímero

[2M+Na]⁺, também se identifica um pico com *m/z* de 439 que pode corresponder a [M-H+Na+K], no entanto não o podemos afirmar com toda a certeza (anexo 3).

II.2.4 Reações de derivados da L-prolina com nucleófilos de carbono

II.2.4.1 Reações entre isocianatos e nucleófilos de carbono

A obtenção de isocianatos é conseguida através do rearranjo de Curtius, isto é, ao submeter uma acilazida a aquecimento esta decompõe-se e dá origem ao isocianato correspondente. Os isocianatos são compostos bastantes reativos, assim sendo, optou-se por formar o isocianato e *in situ*, armadilhá-lo com um reagente de Grignard para originar a amida pretendida (esquema 22).



R = Boc, Cbz, Troc, Fmoc, carbodiimida

Esquema 22 - Método adotado para a síntese de amidas, a partir de acilazidas, por rearranjo de Curtius.

A reação ocorre em duas fases, a primeira é o rearranjo de Curtius, isto é, a formação do isocianato e a segunda é a reação deste com o reagente de Grignard.

Numa primeira fase a acilazida *N*-derivatizada, dissolvida em tolueno é submetida a aquecimento de 65 °C. A reação do rearranjo foi acompanhada por IV devido às bandas características que os grupos funcionais azida e isocianato apresentam. Após o desaparecimento da banda da azida (aproximadamente a 2140 cm⁻¹) e o aparecimento da banda do isocianato (aproximadamente a 2240 cm⁻¹) parou-se o aquecimento. Dependendo do substrato este aquecimento pode ir de 30 min a 1 h.

Numa segunda fase, a solução contendo o isocianato formado é arrefecida até 0 °C, e a essa temperatura é adicionado o reagente de Grignard. Como reagente modelo para estas reações usou-se o reagente comercial brometo de fenilmagnésio. O *work-up* da reação envolveu a adição de água de forma a destruir restos de reagente de Grignard que não tenha reagido e protonar espécies aniónicas presentes, de seguida evaporou-se o solvente orgânico e efetuaram-se extrações com diclorometano tendo-se obtido os respetivos compostos após

purificação através de uma coluna de cromatografia em sílica gel, com eluente hexano:acetato de etilo (7:3). Foram obtidos os compostos representados na figura 20.

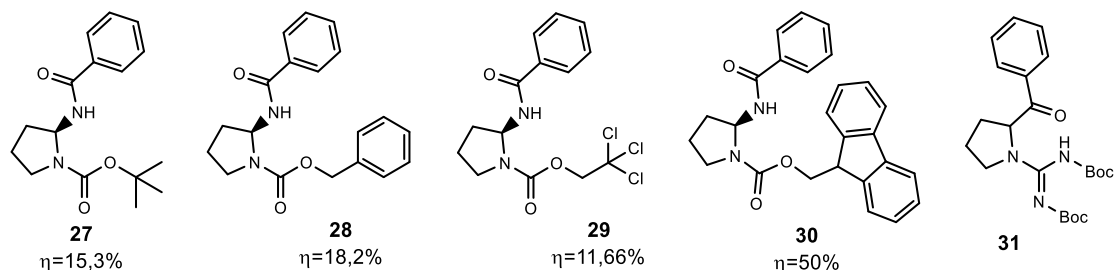


Figura 20 - Composto obtidos nas reações entre isocianatos e o brometo de fenilmagnésio: *N*-terc-butil 1-carboxilato-(*S*)-2-benzamido pirrolidina (**27**), (*S*)-2-benzamidopirrolidina-1-carboxilato de benzilo (**28**), (*S*)-2-benzamidopirrolidina-1-carboxilato de 2,2,2-tricloroetil (**29**), 9-Fluorenilmetil-(*S*)-2-benzamidopirrolidina-1-carboxilato (**30**), terc-butil (*E*)-((2-benzoilpirrolidín-1-il)((terc-butoxicarbonil)amino)metileno)carbamato (**31**).

Os rendimentos baixos podem estar relacionados com a presença de água no meio reacional, o que pode levar à destruição de reagente de Grignard assim como também à hidrólise do isocianato. Também não se pode excluir o ataque do reagente de Grignard ao grupo carbonilo do carbamato. Todos os compostos obtidos foram analisados por IV e por ^1H -RMN em CDCl_3 , e os compostos **28** e **31** foram também analisados por LC-MS.

No espectro de IV do composto **27** é possível verificar a presença das bandas referentes ao esqueleto da prolina, como também a banda a 3381 cm^{-1} corresponde aos alongamentos N-H da amida e a banda a 1698 cm^{-1} corresponde aos dois carbonilos presentes na estrutura da molécula.

A análise do espectro de ^1H -RMN confirma a obtenção do composto através de sinais a campo baixo respeitantes ao anel aromático presente na estrutura do composto **27**, mais precisamente os quatro multipletos a δ 7,88-7,79 ppm, δ 7,75-7,73 ppm, δ 7,64-7,47 ppm e δ 7,46-7,34 ppm, com integração total para cinco prótons, correspondentes aos prótons do anel aromático. A δ 6,21 ppm é possível observar um singuleto largo, com integração para um próton, que corresponde ao próton da amida. Característico destes compostos é o sinal do próton do átomo C-2 que devido à vizinhança de dois átomos de azoto aparece mais desblindado a δ 5,8 e 5,7 ppm como dois multipletos muito pouco definidos. Este desvio já se encontra próximo do desvio químico encontrado para este próton na molécula da cernumidina que surge a δ 5,78 ppm.⁴ Os restantes sinais são característicos e comuns ao esqueleto da prolina (figura 21).

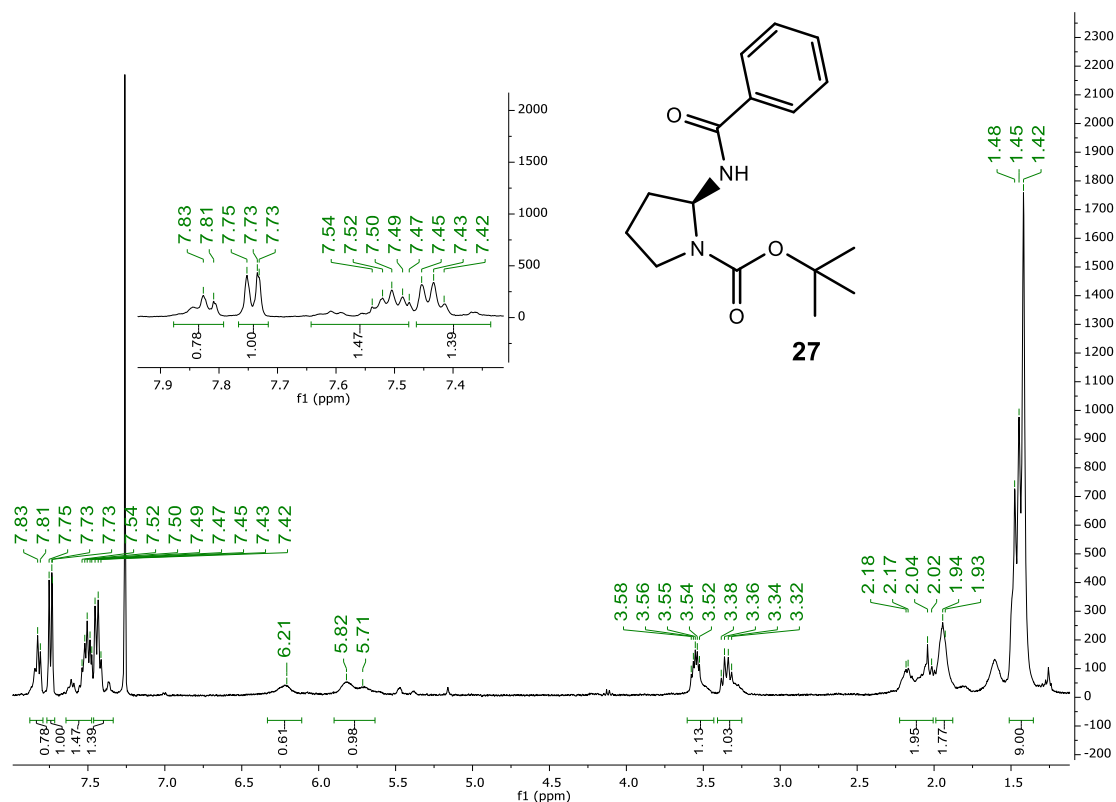


Figura 21 - Espectro de ^1H -RMN do composto **27**, realizado em CDCl_3 com expansão da zona aromática.

A análise do espectro de IV do composto **28** indica a presença de todos os grupos funcionais espectáveis. A 3306 cm^{-1} está presente uma banda de intensidade média correspondente ao alongamento N-H da amida. O carbonilo da amida corresponde à banda a 1651 cm^{-1} e o carbonilo do carbamato corresponde à banda 1707 cm^{-1} .

O espectro de ^1H -RMN evidência a estrutura do composto obtido, através da presença de um multipeto de δ 7,90 a 7,11 ppm com integração para dez prótons, correspondentes aos dois anéis aromáticos presentes na estrutura da molécula. A presença do sinal a δ 6,54 ppm respeitante ao próton da amida formada também constitui uma evidência para a confirmação do composto obtido, assim como os sinais multipeto a δ 5,9 e 5,7 ppm correspondentes ao próton em C-2 (figura 22).

Também por ESI foi possível confirmar a estrutura obtida através de um pico a m/z 325 correspondente à molécula protonada $[\text{M}+\text{H}]^+$ e ao pico m/z 347 correspondente ao aduto de sódio $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (anexo 4).

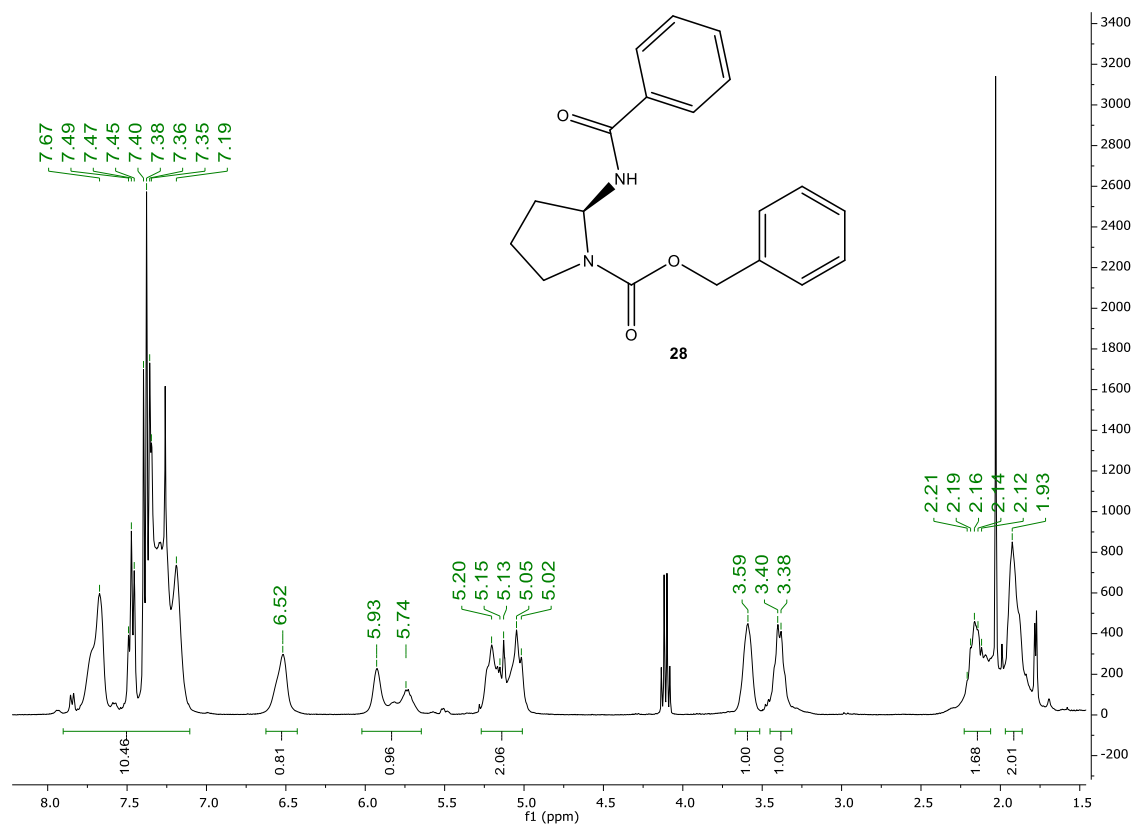


Figura 22 - Espectro de ^1H -RMN do composto **28**, efetuado em CDCl_3 .

O espectro de IV do composto **29** confirma a formação da amida através da banda a 3369 cm^{-1} . Também é possível corresponder a banda intensa a 1720 cm^{-1} aos dois grupos carbonilo presentes na estrutura da molécula.

A análise do espectro de ^1H -RMN evidencia a formação do produto esperado através da presença de sinais característicos do anel aromático, nomeadamente o duplete a $\delta\ 7,75\text{ ppm}$, e os dois tripletos a $\delta\ 7,49$ e $7,41\text{ ppm}$ com integração total de cinco prótons aromáticos, correspondentes aos prótons do anel aromático. O singuleto largo a $\delta\ 6,41\text{ ppm}$, respeitante ao próton da amida, e os multipletos a $\delta\ 5,9$ e $5,7\text{ ppm}$ respeitantes ao próton em C-2, constituem mais duas evidência para a confirmação da formação do composto **29**. Os restantes sinais encontram-se de acordo com o espetável (figura 23).

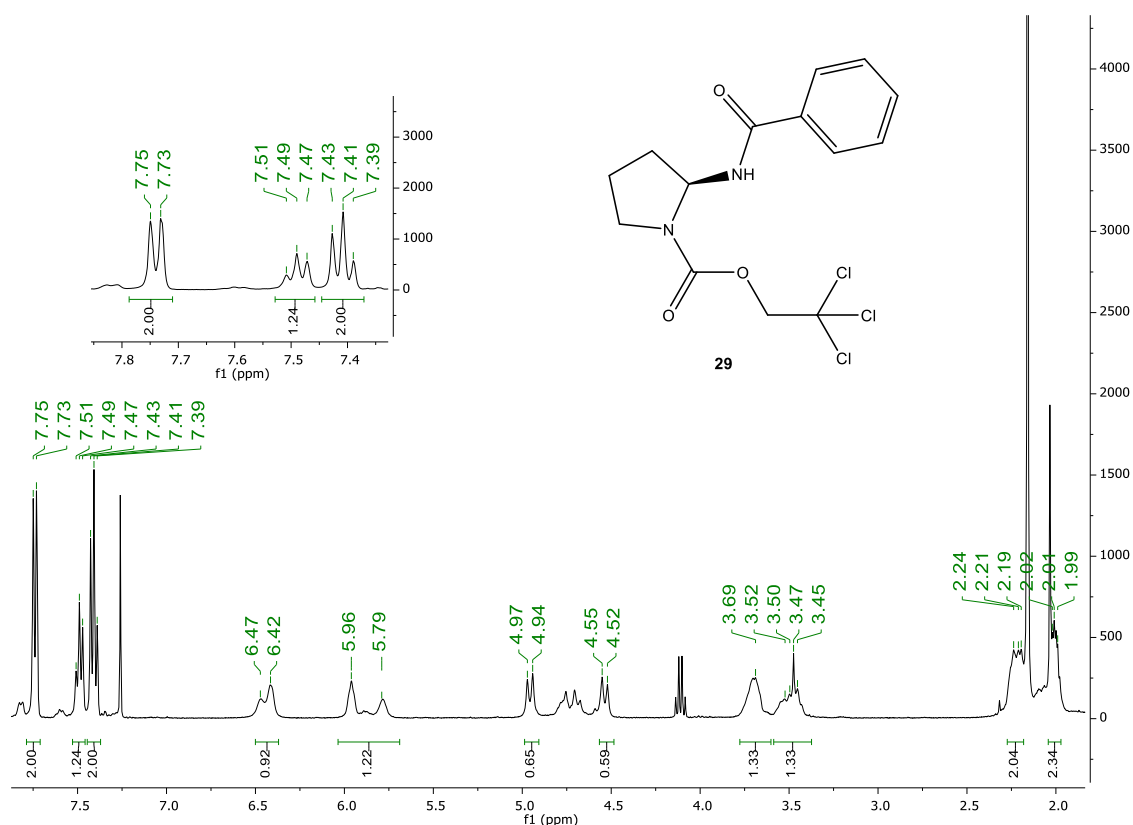


Figura 23 - Espectro de ^1H -RMN do composto **29**, realizado em CDCl_3 e respectiva expansão na zona aromática.

O espectro de IV do composto **30** confirma a presença de todos os grupos funcionais esperados na estrutura da molécula. A formação do composto é confirmada pela banda de intensidade média a 3320 cm^{-1} respeitante ao alongamento da ligação N-H da amida. Também o espectro de ^1H -RMN confirma a estrutura do produto obtido, novamente pelo sinal característico do próton em C-2 a δ 5,9 e 5,7 ppm. Verificou-se também um aumento de oito prótons para treze prótons (removendo a contribuição do CDCl_3 nesta zona) na integração do multipeto respeitante aos anéis aromáticos presentes na molécula (figura 24).

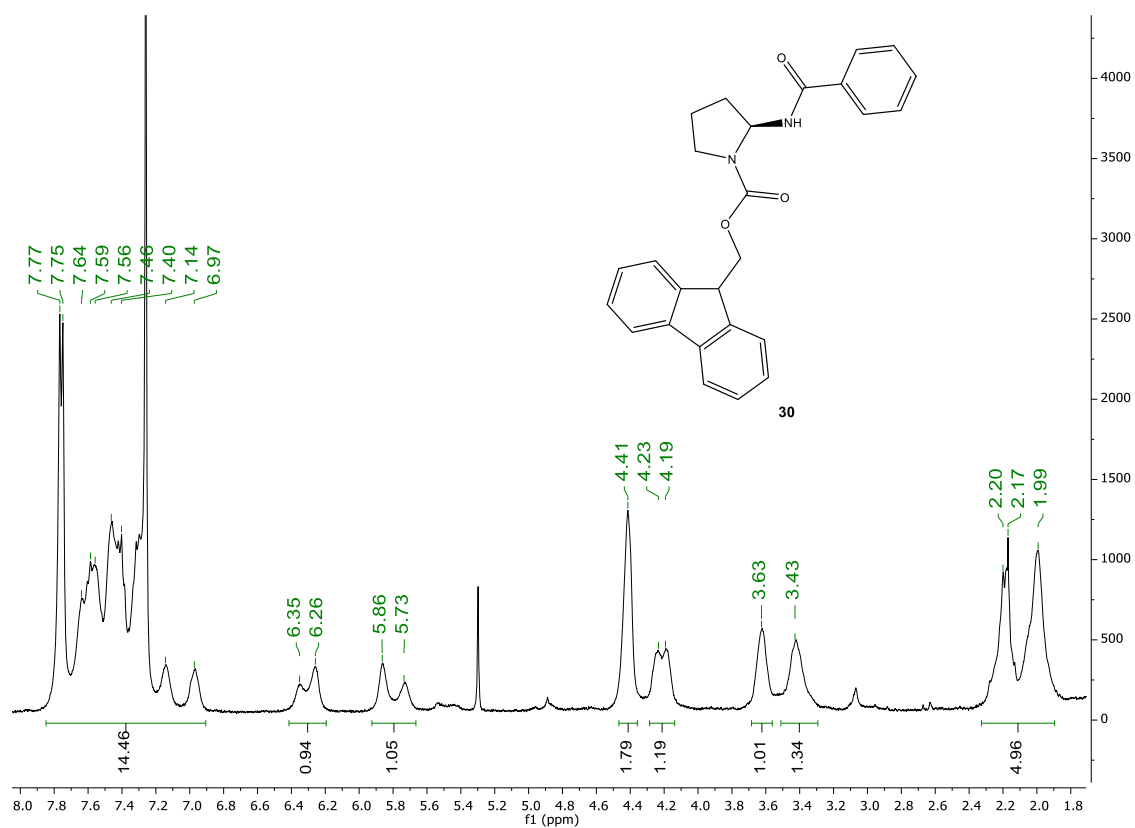


Figura 24 - Espectro de ^1H -RMN do composto **30**, obtido através da reação entre o isocianato e o brometo de fenilmagnésio, realizado em CDCl_3 .

A reação entre o composto **15** (*N*-*tert*-butil ((2-benzamido-1-pirrolidinil)((*tert*-butoxycarbonil)imino)metil)carbamato) e o brometo de fenilmagnésio, depois de aquecimento não formou o composto esperado. Esperava-se obter o composto **32**, no entanto através da análise do espectro de ^1H -RMN, assim como do espectro de massa do composto obtido verificou-se que se obteve o composto **31**.

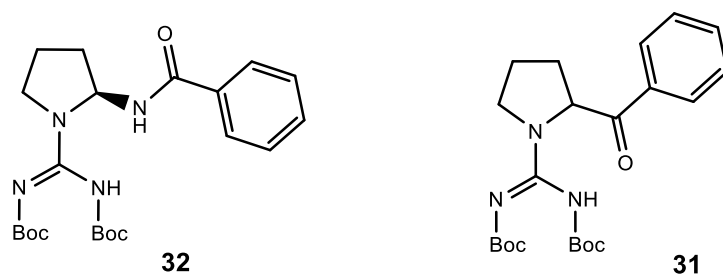


Figura 25 - Estrutura dos compostos *N*-*tert*-butil ((2-benzamido-1-pirrolidinil)((*tert*-butoxycarbonil)imino)metil)carbamato (**32**) e *tert*-butil (*E*)-((2-benzoylpirrolidin-1-il)((*tert*-butoxycarbonil)amino)metileno)carbamato (**31**).

Através do espectro de ^1H -RMN é possível observar a ausência do próton correspondente à amida (anexo 5). No entanto, é no espectro de LC-MS que se confirma a obtenção do composto **31**, através do pico m/z 418 respeitante à molécula protonada $[\text{M}+\text{H}]^+$. Também é possível corresponder vários sinais presentes no espectro a adutos formados, com é o caso do sinal a m/z 440 correspondente ao aduto com o sódio $[\text{M}+\text{Na}]^+$, o sinal a m/z 857 corresponde ao aduto do sódio com o dímero $[2\text{M}+\text{Na}]^+$ e o sinal a m/z 873 corresponde ao aduto do potássio com o dímero $[2\text{M}+\text{K}]^+$ (anexo 6).

Através do composto obtido é possível afirmar que o rearranjo de Curtius não ocorreu. O rearranjo de Curtius foi acompanhado por IV onde observou-se o desaparecimento da banda da azida, contudo não se observou o aparecimento da banda do isocianato, ainda assim adicionou-se o reagente de Grignard, obtendo-se o composto **31**. É possível que a acilazida se tenha degradado.

II.2.4.2 Reações entre carbamoilazidas e nucleófilos de carbono

O ataque nucleofílico ao carbono do carbonilo de uma carbamoil azida, por parte do carbono ligado diretamente ao magnésio do reagente de Grignard, é possível uma vez que estes têm cargas parciais opostas.

O átomo de carbono do grupo carbonilo da carbamoil azida apresenta uma carga parcialmente positiva pois está diretamente ligado a três heteroátomos (oxigénio e azoto) bastante eletronegativos. O carbono do reagente de Grignard tem uma carga parcialmente negativa porque a ligação carbono-magnésio está polarizada na direção do carbono uma vez que o magnésio é menos eletronegativo que o carbono.⁸

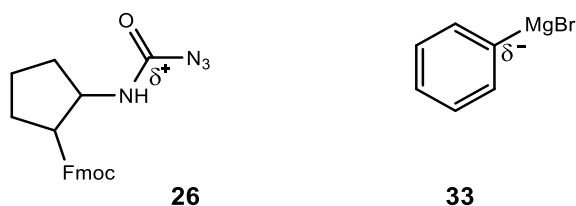
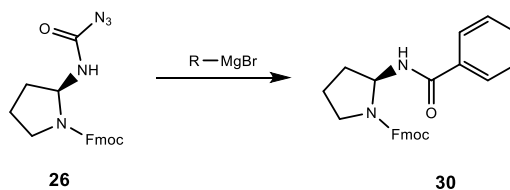


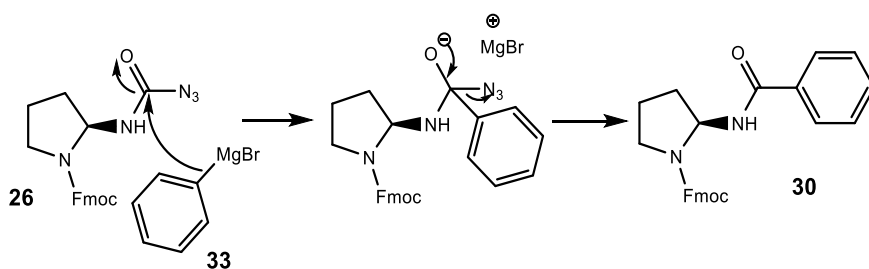
Figura 26 - Representação das gargas parciais das moléculas envolvidas na reação: N-Fmoc-carbamoil azida (**26**) e Brometo de fenilmagnésio (**33**).

Esta reação tem como objetivo a formação de uma amida com uma funcionalização de interesse para o decorrente estudo e foi realizada a partir do composto **26** (N-Fmoc-carbamoil azida) que por ataque nucleofílico por parte do reagente de Grignard origina o composto **30**, já obtido no capítulo II.2.4.1. (esquema 23).



Esquema 23 - Método adotado para a reação entre carbamoil azidas e nucleófilos de carbono.

Fez-se reagir o composto **26** (*N*-fmoc-carbamoil-azida) com brometo de fenilmagnésio (**33**) em THF. A reação foi acompanhada por c.c.f. e usou-se reagente Dragendorff como revelador. Quando se observou o completo consumo do composto **26**, adicionou-se água ao meio reacional e efetuaram-se extrações com diclorometano. O crude obtido sofreu uma purificação por cromatografia em coluna, com eluente de diclorometano com 1% de metanol e obteve-se o composto **30** num rendimento de 29,72%, confirmado por IV, LC-MS, 1H -RMN e ^{13}C -RMN em $CDCl_3$.



Esquema 24 - Mecanismo de reação entre a *N*-Fmoc-carbamoil-azida (**26**) e o brometo de fenilmagnésio (**33**).

O mecanismo reacional inicia-se com um ataque nucleofílico por parte do carbono do reagente de Grignard ao carbono do carbonilo da acilazida. De seguida, de modo a reconstituir o carácter duplo da ligação carbono-oxigénio, a azida é eliminada e origina-se o composto **30** (esquema 24).

Numa primeira análise, comparou-se os espectros de IV do composto **30** obtido através da reação entre o respetivo isocianato e o mesmo reagente de Grignard com o espectro do composto obtido no decorrente método e a semelhança entre os dois, confirmou que a reação foi bem sucedida. O espectro de 1H -RMN também se encontra semelhante ao descrito no capítulo II.2.4.1 para o composto **30** (anexo 7).

No espectro de ^{13}C -RMN a maior evidência que confirma a estrutura do composto obtido é o aumento do número de sinais de carbono, na zona aromática, em comparação com o

espectro de ^{13}C -RMN do composto *N*-Fmoc-acilazida (**22**). Os sinais a δ 132,19, 131,77, 128,78 e 127,20 ppm são respeitantes aos carbonos 8, 9, 10 e 11 (figura 27).

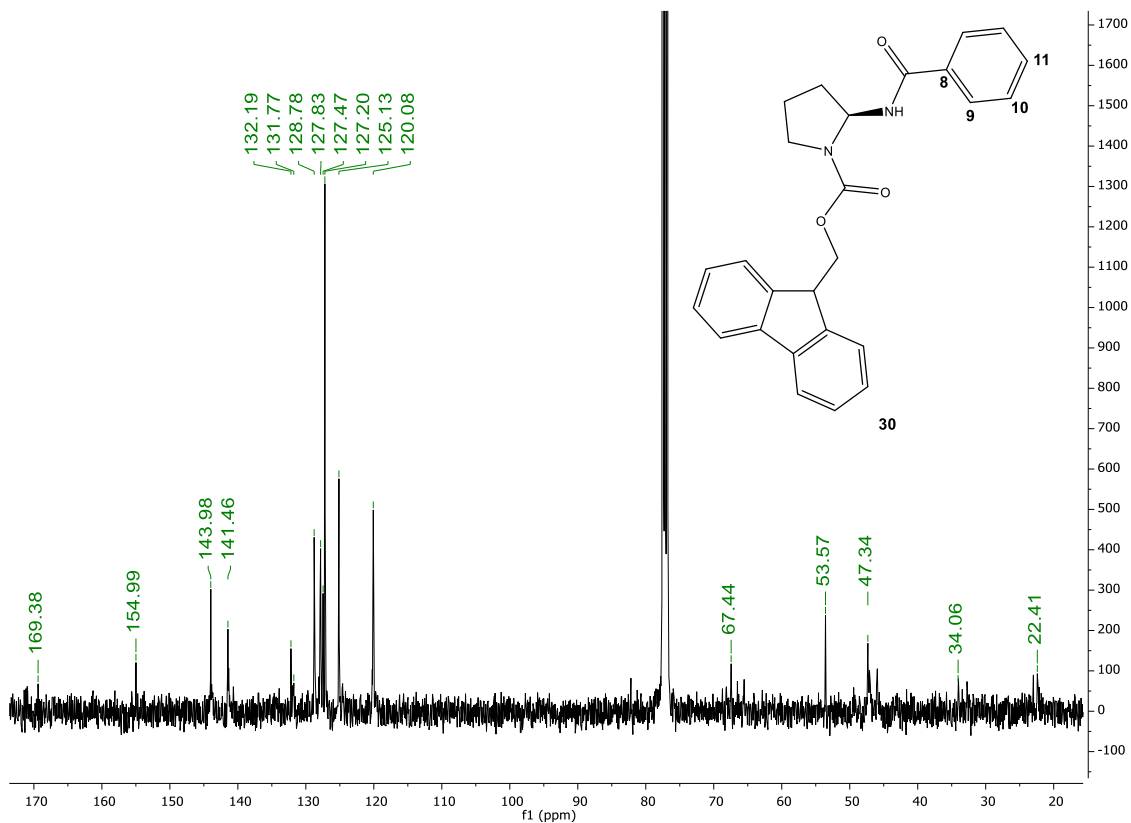
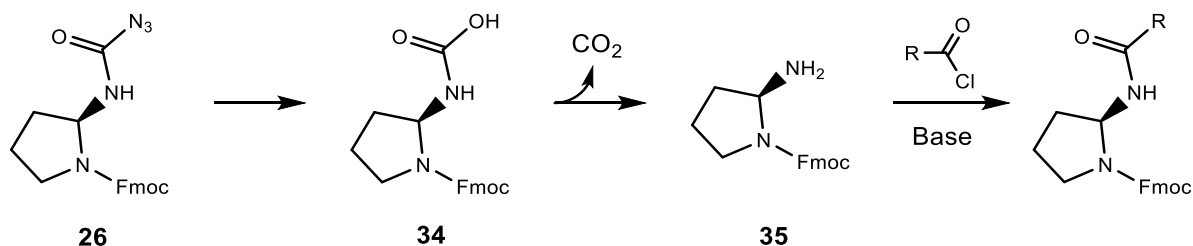


Figura 27 - Espectro de ^{13}C -RMN do composto **30**, realizado em CDCl_3 .

Também por LC-MS é possível confirmar a estrutura obtida através do pico m/z 413 respeitante à molécula protonada $[\text{M}+\text{H}]^+$ e ao pico m/z 847 que corresponde ao aduto do sódio com o dímero $[\text{2M}+\text{Na}]^+$ (anexo 8).

II.2.5 Preparação do ácido carbâmico

A obtenção da espécie carbamoil azida com o grupo amida na posição pretendida tornou possível explorar uma nova abordagem para a obtenção de aminas (esquema 25).



Esquema 25 - Método proposto para a derivatização do grupo carbamoilazida.

Com o seguinte método pretendia-se hidrolisar a carbamoil azida a ácido carbâmico e depois por descarboxilação formar a amina que poderia reagir com cloretos de acilo formando-se as amidas correspondentes.

Para a obtenção do composto **34**, fez-se reagir a *N*-fmoc-carbamoilazida **26**, em THF, com uma solução saturada de bicarbonato de sódio. A reação foi acompanhada por c.c.f. e usou-se reagente de Dragendorff como revelador, onde se observou o aparecimento de algumas manchas. O *work-up* da reação envolveu a evaporação do THF a pressão reduzida, adição de água e extrações com diclorometano. Obteve-se um crude que foi submetido a purificação por cromatografia em camada preparativa e obteve-se 3,2 mg do um produto, que foi caracterizado através de IV e ^1H -RMN em CDCl_3 .

No espectro de IV do composto obtido é possível confirmar a presença do grupo hidroxilo através da banda larga entre 3500 e 3000 cm^{-1} , também é possível observar uma banda a 1643 cm^{-1} correspondente aos grupos carbonilo presentes na molécula. A análise do espectro de ^1H -RMN remete para a presença do composto, uma vez que a os sinais respeitantes ao grupo protetor e ao esqueleto da L-prolina se encontram bastante semelhantes aos sinais do espectro de ^1H -RMN do composto **26**, contudo não é possível observar o protão respeitante à amida. O protão da amida assim como o protão do grupo hidroxilo têm carácter lábil, logo nem sempre são visíveis no espectro de ^1H -RMN (figura 28). Teria sido importante a realização do espectro de massa para confirmação da presença do composto já que não se espera grandes diferenças no RMN quer em relação ao composto de partida quer em relação ao composto amina resultante da descarboxilação. Seria interessante promover esta reação na presença *in situ* do cloreto de acilo.

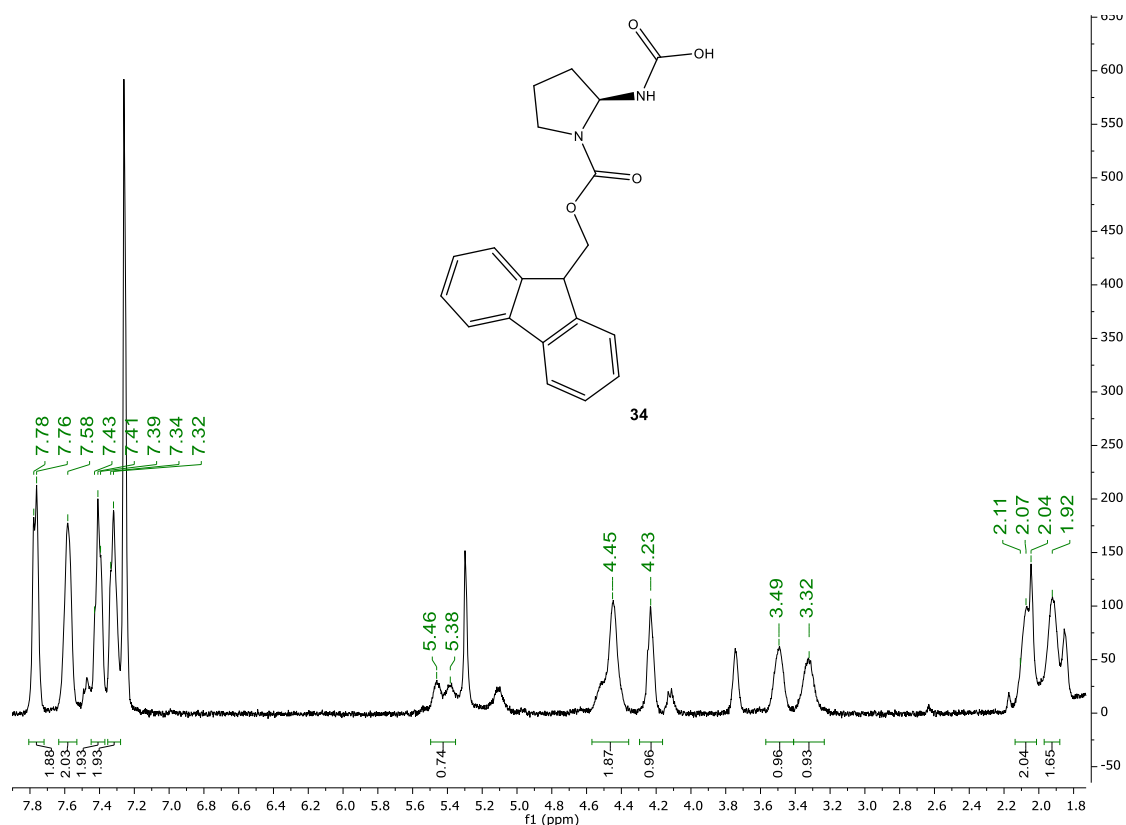


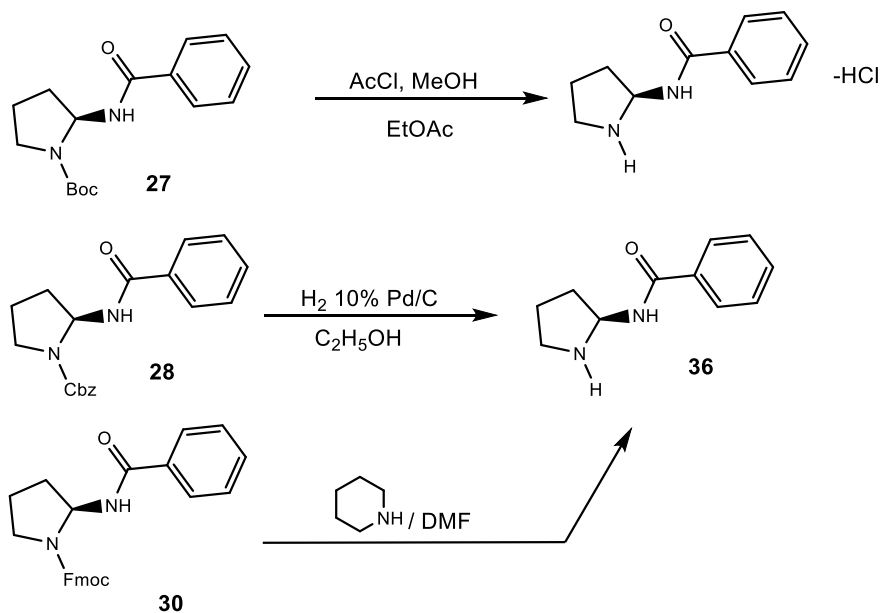
Figura 28 - Espectro de ^1H -RMN do composto **34** N-Fmoc-ácido-carbâmico, realizado em CDCl_3 .

O rendimento desta reação foi bastante baixo, o que se acredita ser devido à instabilidade do grupo funcional ácido carbâmico. Este grupo funcional é conhecido por sofrer descarboxilação facilmente, dando origem à respectiva amina, com libertação de CO_2 .³⁴

II.2.6 Remoção dos grupos protetores

A remoção de carbamatos como grupos protetores está amplamente descrita na literatura. Contudo, as reações de desproteção constituíram um dos maiores entraves para a viabilidade das vias sintéticas delineadas. No esquema 26 estão apresentadas as abordagens desenvolvidas no decorrer deste trabalho para a remoção dos grupos de proteção.

O grupo protetor Troc não chegou a ser removido no decorrer deste estudo por se esperar um comportamento idêntico ao da remoção do Cbz como se verá adiante.

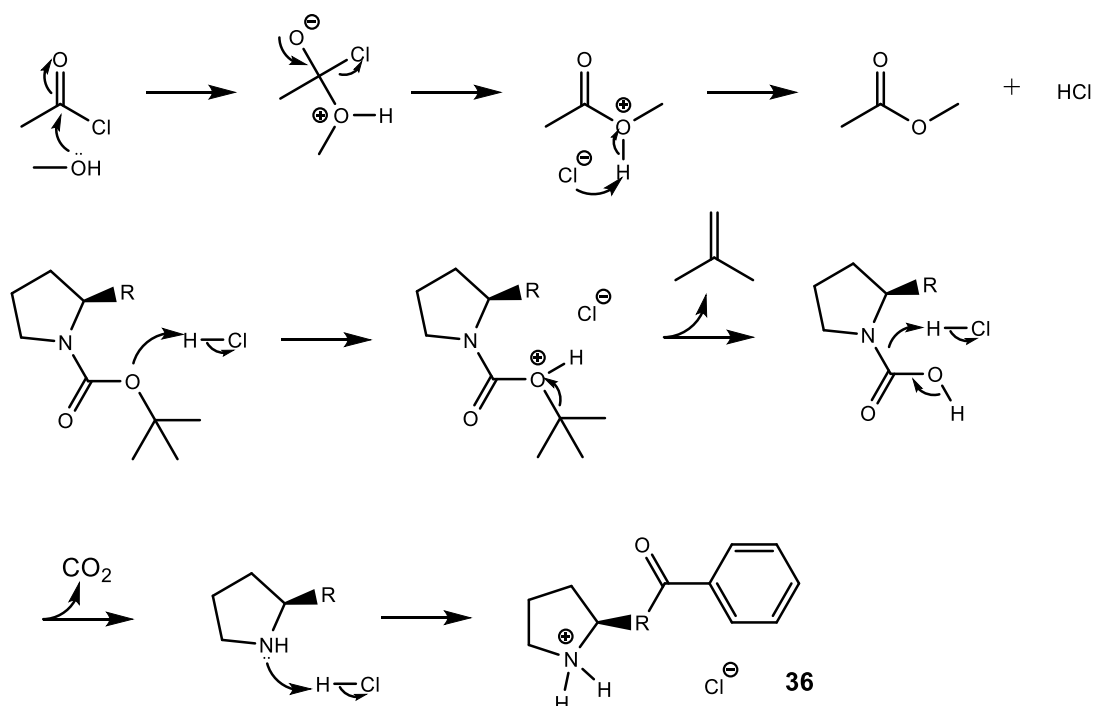


Esquema 26 – Metodologias adotadas para a obtenção do composto (S)-N-2-pirrolidinil-benzamida (**36**).

II.2.6.1 Remoção do grupo *terc*-butiloxicarbonil (Boc)

A remoção do grupo protetor *terc*-butiloxicarbonil (boc) do composto **27** foi realizada em meio ácido pela geração *in situ* de HCl em acetato de etilo. O meio ácido foi conseguido através da reação entre o cloreto de acetilo e o metanol, que origina HCl anidro em solução.

A reação de formação do HCl envolve a formação de acetato de metilo como produto lateral que é também o solvente desta reação. De seguida o HCl promove a reação de remoção do grupo Boc tal como apresentado no esquema 27. Na presença de HCl em excesso, o par de elétrons livre do oxigénio do carbamato capta o hidrogénio do HCl, de seguida, para neutralizar a carga formada, há eliminação do isobuteno, formando assim o ácido carbâmico. Este sofre descarboxilação originando a amina livre. Devido às condições ácidas, o produto é obtido sob a forma de um sal de HCl (esquema 27).



Esquema 27 - Mecanismo de remoção ácida do grupo protetor Boc.

O composto **36** foi obtido sob a forma de hidrocloreto com rendimento de 39,57% e a sua confirmação foi obtida por ¹H-RMN em D₂O e LC-MS.

No espectro de ¹H-RMN do composto obtido é possível observar-se o desaparecimento dos dois singuletos a δ 1,45 e 1,42 ppm com integração para nove prótons respeitantes aos grupos metilo do grupo protetor, evidenciando assim o sucesso da remoção do grupo protetor Boc. Os restantes sinais estão de acordo com o esperado (figura 29).

Também o espectro de LC-MS evidência o composto obtido através do sinal a *m/z* 191 correspondente à molécula protonada [M+H]⁺ e ao sinal a *m/z* 381 respeitante ao dímero protonado [2M+H]⁺ (anexo 9).

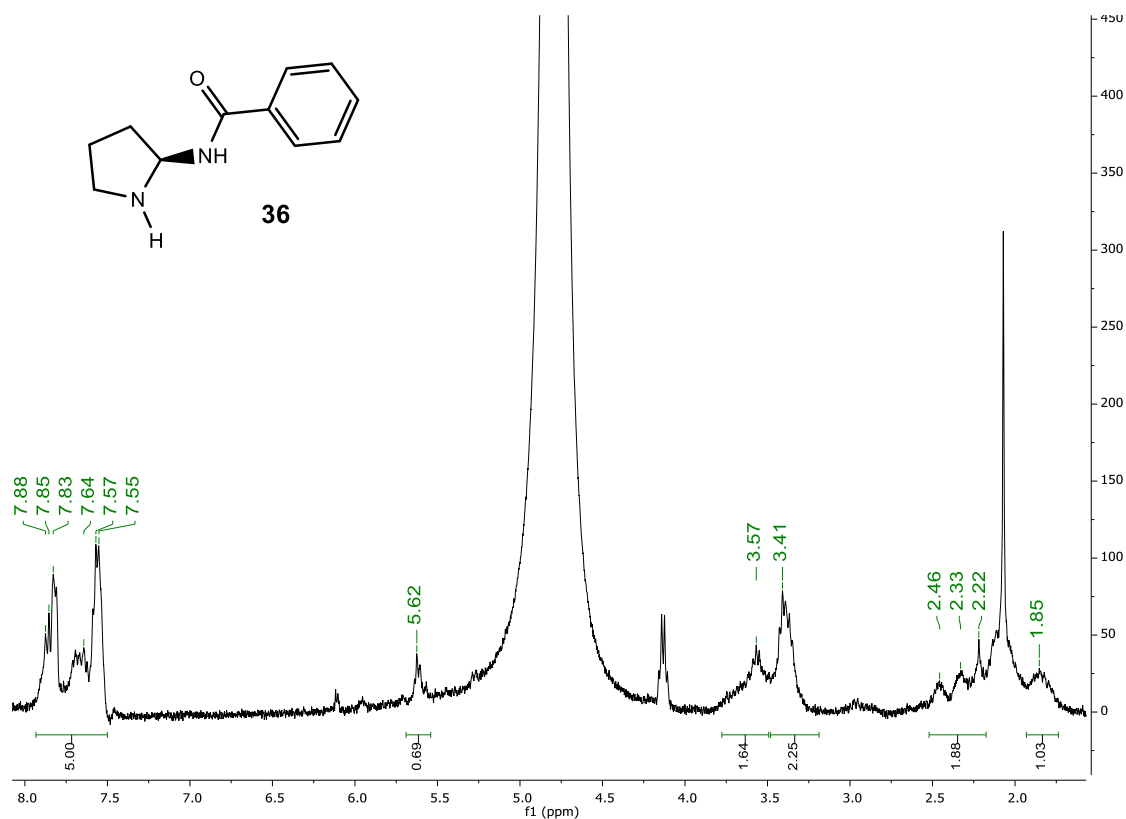
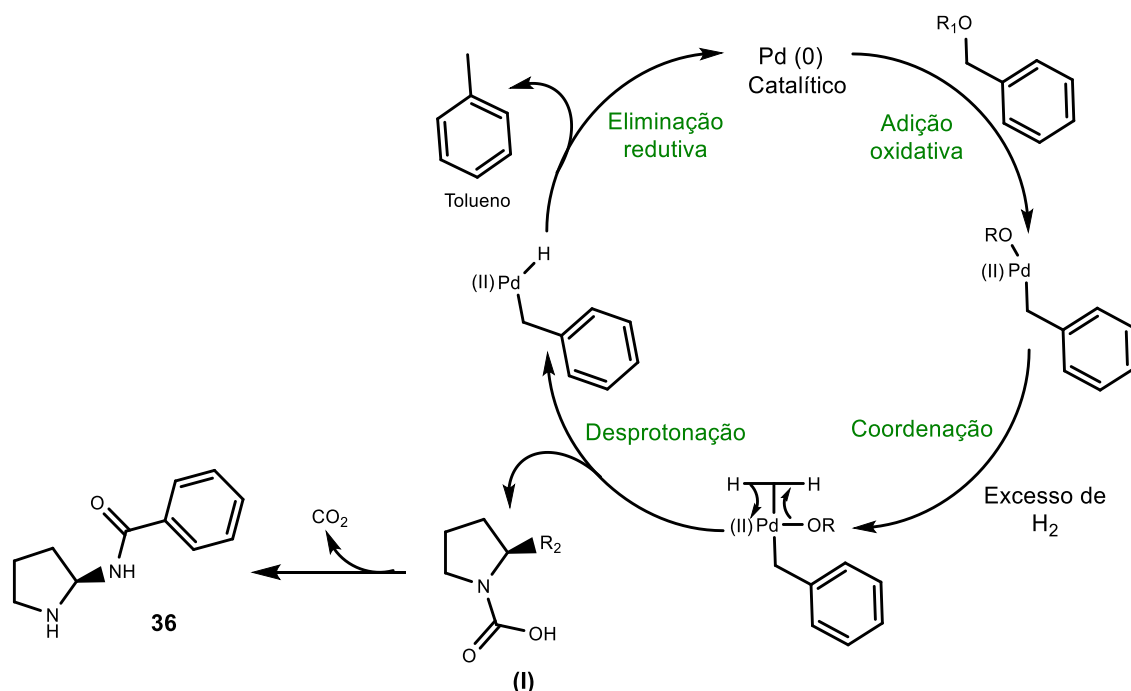


Figura 29 - Espectro de ^1H -RMN do composto **36**, obtido em D_2O .

II.2.6.2 Remoção do grupo benziloxycarbonil (Cbz)

A remoção do grupo protetor Cbz foi efetuada por hidrogenação catalítica, com paládio sobre carvão ativado em etanol. Neste caso específico a reação chama-se de hidrogenólise pois envolve a clivagem da cadeia (neste caso o grupo benzilo) e o heteroátomo (oxigênio).

O mecanismo reacional envolve a adição oxidativa do composto **28** ao paládio, seguido de coordenação. De seguida os átomos de hidrogénio são transferidos da superfície metálica catalítica para o composto. A desprotonação origina o composto (**I**), que por descarboxilação dá origem à amina livre, ou seja, ao composto **36**. Em relação ao paládio, este sofre eliminação redutiva, regenerando-se (esquema 28).



Esquema 28 - Mecanismo reacional para a obtenção do composto **36**, por remoção do grupo Cbz.

O composto obtido foi analisado por IV, 1H -RMN em $CDCl_3$ e LC-MS. Concluiu-se a presença vestigial do composto **36**, contudo obteve-se essencialmente benzilamida.

A benzilamida pode ter sido formada através de uma clivagem heterolítica entre o átomo de carbono C-2 e o azoto da amida.

No espectro de IV apenas é possível identificar a benzilamida. As bandas a 3366 e 3175 cm^{-1} são respeitantes ao alongamento das ligações N-H. As duas bandas intensas presentes a 1648 e 1623 cm^{-1} correspondem ao carbonilo da amida, enquanto que a banda com frequência maior corresponde ao alongamento da ligação C=O, a banda de menor frequência corresponde à ligação N-H.

No espectro de 1H -RMN é possível verificar que houve formação dos dois compostos, a benzilamida e o composto **36**. Os sinais respeitantes à benzilamida apresentam intensidade elevada e estão assinalados na expansão no espectro representado na figura 30. Após a atribuição dos sinais da benzilamida é possível concluir a presença do composto **36**, principalmente pelos sinais muito característicos do núcleo pirrolidina assim como do sinal a δ 5,8 ppm que poderá corresponder ao próton do átomo de carbono C-2.

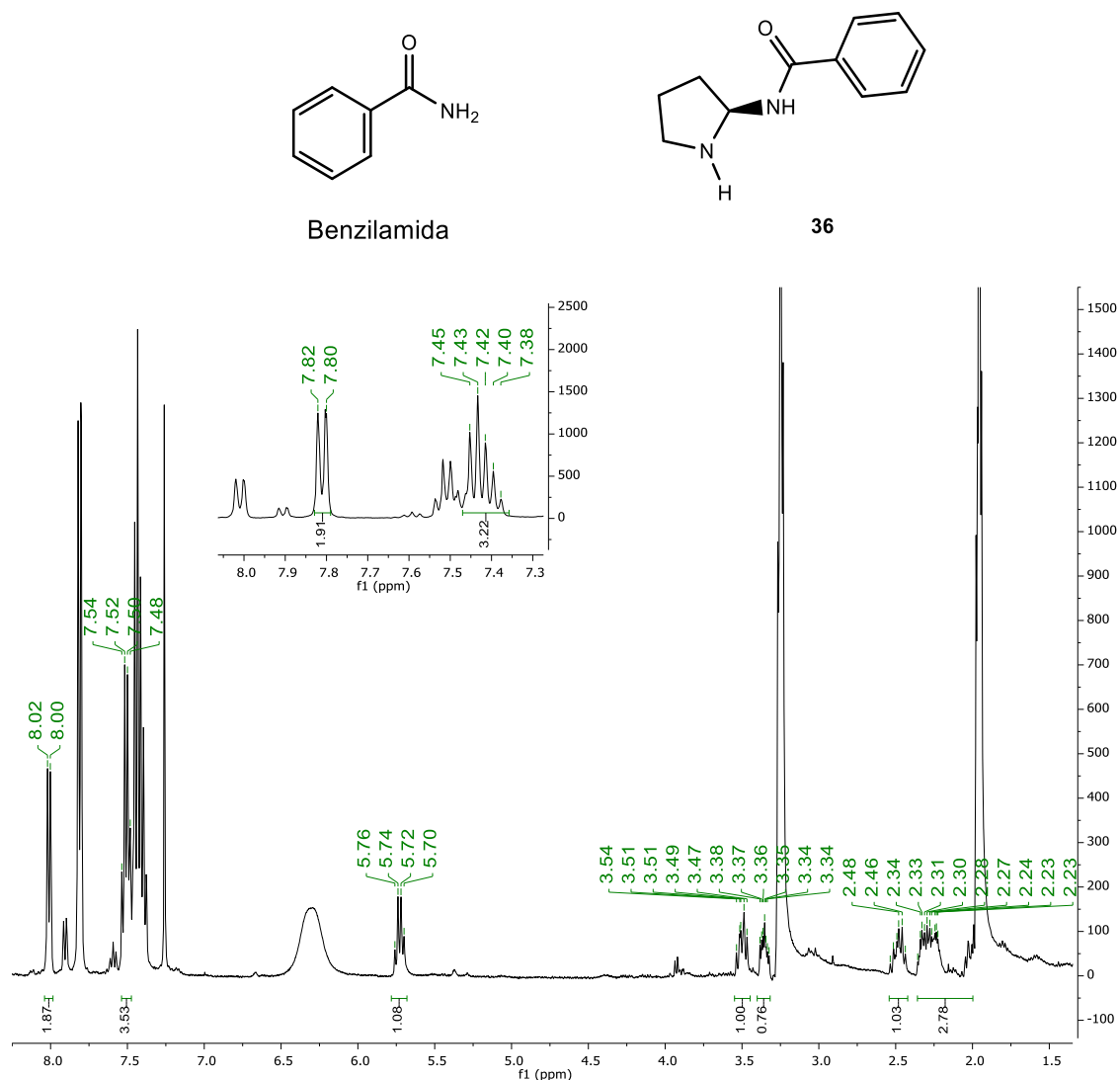


Figura 30 - Espectro de ^1H -RMN obtido, com integração para o composto **36** e expansão na zona aromática com integração para a benzilamida.

No espectro de GC o pico que apresenta maior abundância relativa, com um tempo de retenção de 11,13 minutos, corresponde à benzilamida. Contudo nos tempos de retenção a 7 e 8 minutos foi possível observar dois picos correspondentes a um composto possuindo o núcleo pirrolidina. Nos respetivos espectros de massa é possível observar picos correspondentes a fragmentações do composto **36** (figuras 33 e 34) apesar de não ter sido possível a identificação do ião molecular. O GC-MS não é de todo a técnica mais indicada para detetar o composto **36**.

Após a verificação da presença do composto procedeu-se a uma purificação por cromatografia em camada preparativa, de onde se isolaram dois compostos. Os compostos obtidos foram analisados LC-MS, contudo o composto **36** não está presente em nenhum dos espectros provavelmente por ter degradado durante a injeção.

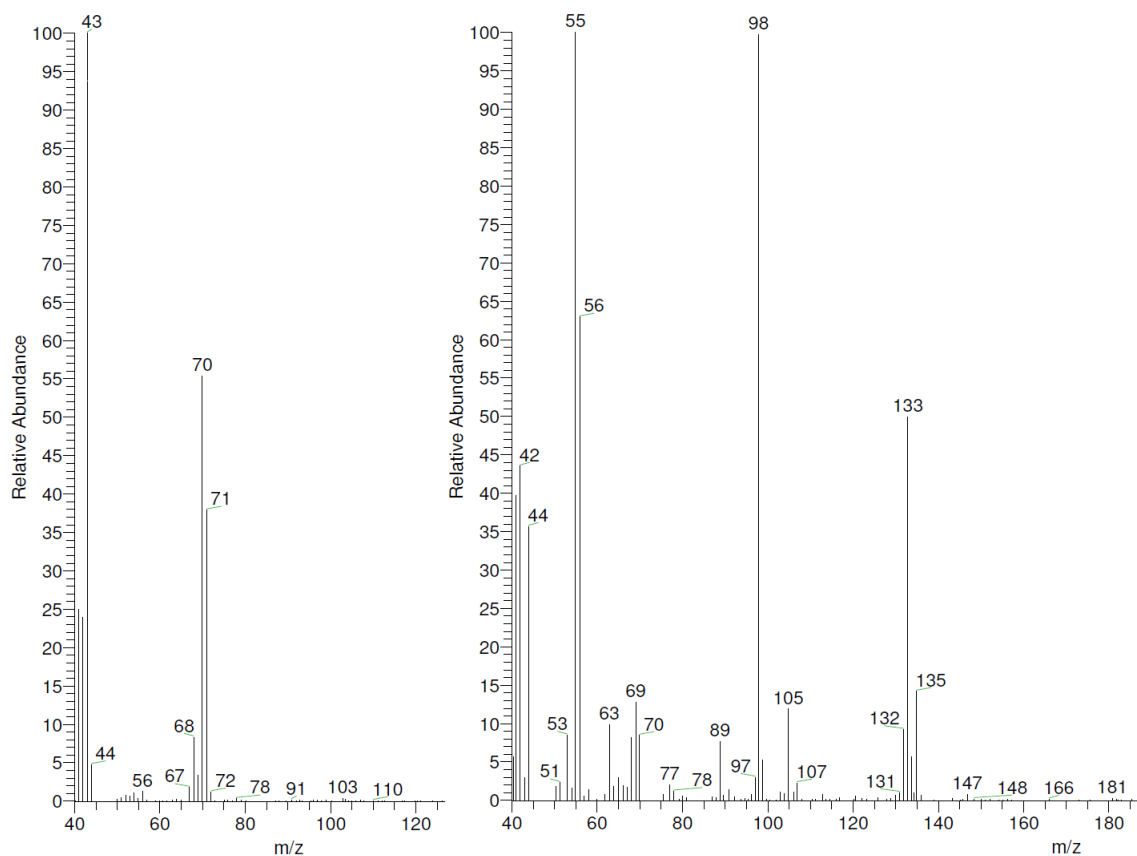


Figura 31 - Ampliação dos espectros de CG-MS para os tempos de retenção de 7,5 minutos e 8 minutos, respectivamente.

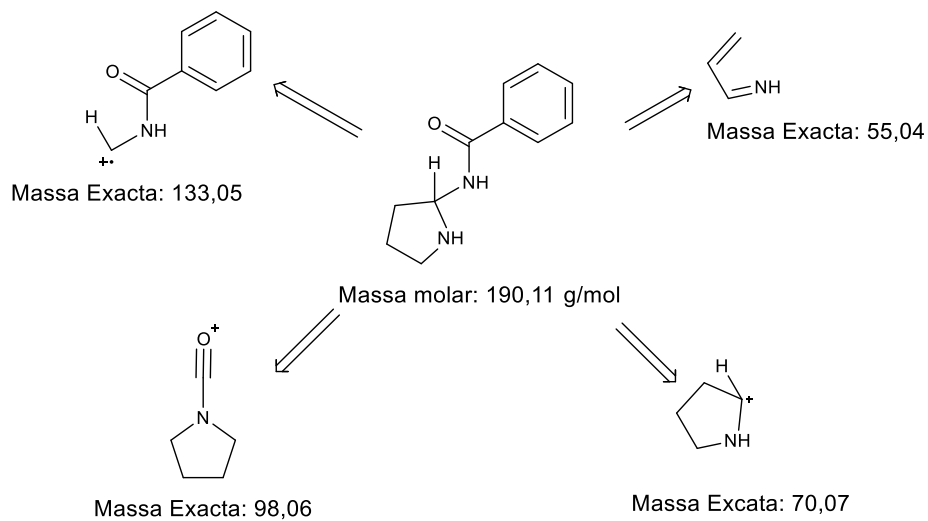
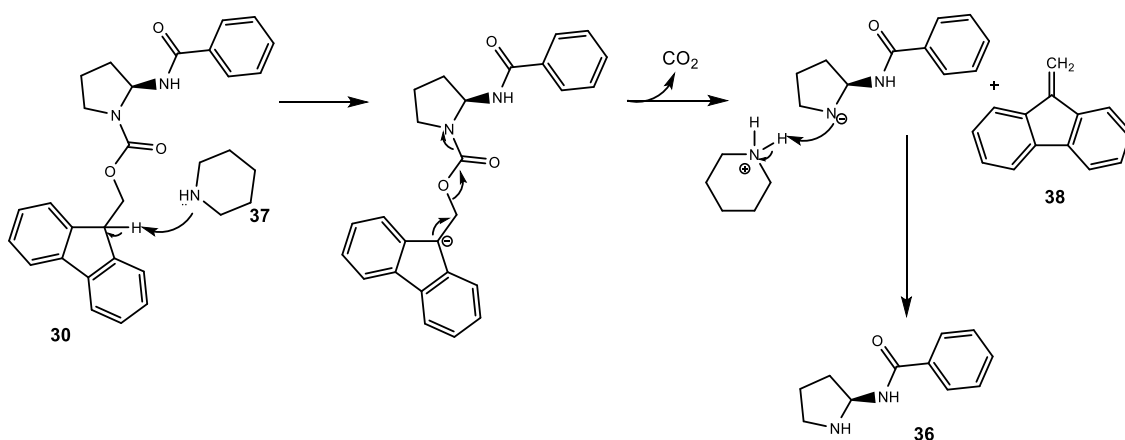


Figura 32 - Possíveis fragmentações do composto **36** identificadas no espectro de GC-MS.

II.2.6.3 Remoção do grupo 9-fluorenilmetoxycarbonil (Fmoc)

Encontra-se descrito na literatura que a remoção do grupo protetor Fmoc é rapidamente conseguida por aminas primárias e secundárias, contudo esta reação é mais lenta se for realizada por aminas terciárias. O solvente também influencia o tempo de reação, sendo que a reação é mais rápida em meios polares. No estudo decorrente a remoção do grupo protetor Fmoc foi realizada numa solução de 5% de piperidina em DMF (dimetilformamida). O *work-up* da reação consistiu na evaporação à secura de forma a remover o solvente. Ao sólido resultante adicionou-se água e lavou-se sucessivamente com acetato de etilo, de modo a remover os compostos laterais formados.



Esquema 29 - Mecanismo de remoção do grupo protetor Fmoc.

O mecanismo reacional envolve a remoção do protão mais ácido do grupo protetor por parte da piperidina (**37**). A neutralização da carga formada desencadeia a eliminação do dibenzofluoreno (**38**) com libertação de dióxido de carbono (esquema 29).

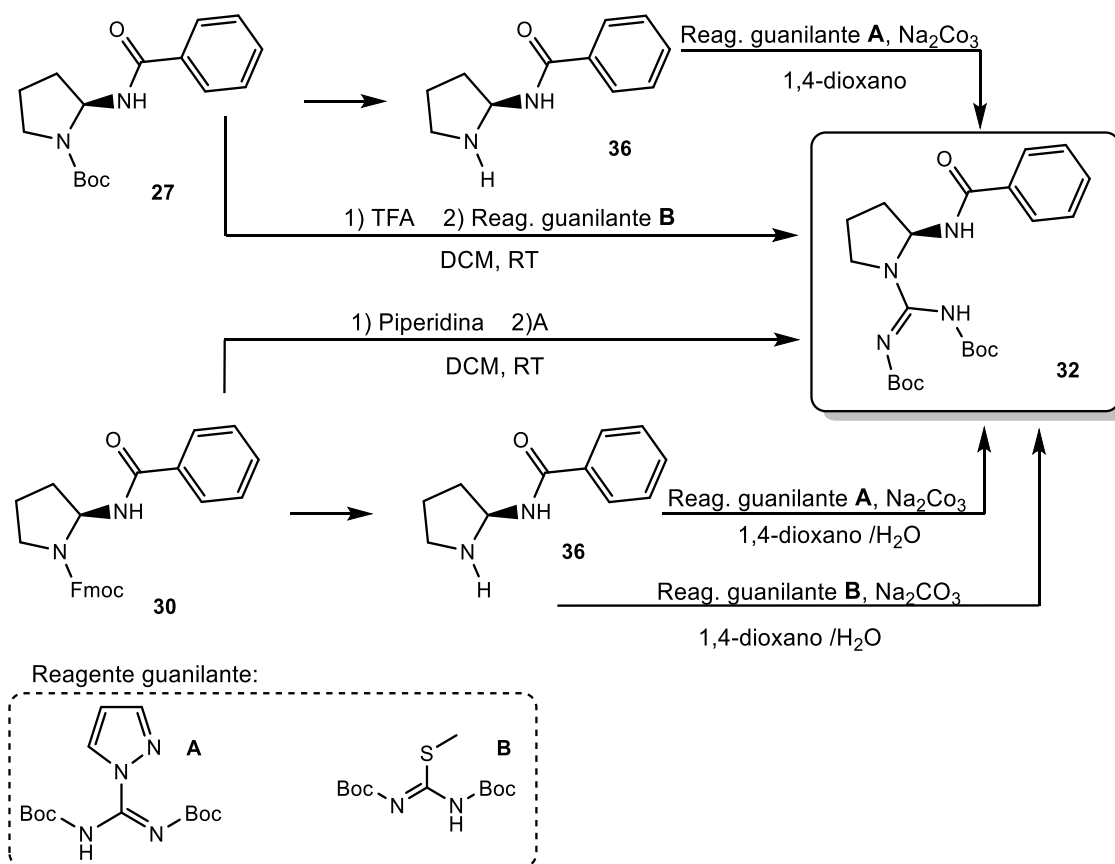
Os compostos obtidos por evaporação das fases orgânica e aquosa foram analisados por IV, ¹H-RMN em CDCl₃ e D₂O e espectrometria de massa. Contudo não foi possível identificar o composto esperado.

Através da análise dos espectros obtidos da fase orgânica foi possível concluir a formação dos compostos 1-(9-fluorenil-metil)piperidina e dibenzofluoreno (anexos 10 e 11).

Acredita-se que o composto pretendido possa ter ficado na fase aquosa. Contudo a quantidade de composto isolado da fase aquosa foi bastante reduzida pelo que as análises realizadas foram inconclusivas (anexos 12 e 13).

II.2.7 Reações de Guanilação

Apesar da remoção dos grupos protetores de aminas não ter sido conseguida com o sucesso esperado, tentou-se realizar a reação de guanilação com os compostos obtidos. As reações de guanilação foram testadas por dois métodos. Numa primeira tentativa fez-se reagir os compostos obtidos das reações de remoção dos grupos protetores (capítulo II.2.6), com reagentes guanilantes. No segundo método removeu-se os grupos protetores e, *in situ*, adicionou-se o reagente guanilante (esquema 30).



Esquema 30 - Metodologia adotada para a formação do composto **32**.

Uma vez que através da análise dos compostos obtidos nas reações de remoção dos grupos protetores não é possível verificar com precisão a presença do composto **36**, decidiu-se realizar as reações de guanilação distinguindo a origem do composto **36**.

Após a remoção do grupo protetor o mecanismo reacional para as reações de guanilação ocorrem conforme o descrito no capítulo II.2.1.2.

II.2.7.1 Reações de guanilação do composto **36**, proveniente da remoção do grupo Boc

Explorou-se a inserção do grupo carbodiimida através de dois métodos. O primeiro consistiu na reação do reagente guanilante com o composto obtido da remoção do Boc, e o segundo consistiu na remoção do Boc e, *in situ*, adicionou-se o reagente guanilante. Ambos os métodos originaram crudes que foram purificados. Todas as frações obtidas foram analisadas e verificou-se por ¹H-RMN que nenhum dos métodos originou o composto **34**.

Neste caso, e apesar de termos verificado a formação de **36** na remoção do Boc com HCl gerado *in situ*, não garantimos que aquando da realização desta experiência o hidrocloreto de (S)-N-2-pirrolidinil-benzamida (**36A**) ainda se encontrasse presente dada a instabilidade esperada para este composto.

II.2.7.2 Reações de guanilação do composto **36**, proveniente da remoção do grupo Fmoc

Explorou-se a inserção do grupo carbodiimida através de dois métodos. O primeiro consistiu na reação do reagente guanilante com o composto obtido da remoção do Fmoc (capítulo II.2.6.3). Neste método testou-se dois reagentes guanilantes diferentes, o 1,3-bis(*tert*-butoxicarbonil)-2-metil-2-tiopseudoureia e *N,N*-di-Boc-1-*H*-pirazole-1-carboxamidina, mantendo as restantes condições reacionais. O segundo consistiu na remoção do Fmoc e, *in situ*, adicionou-se o reagente guanilante.

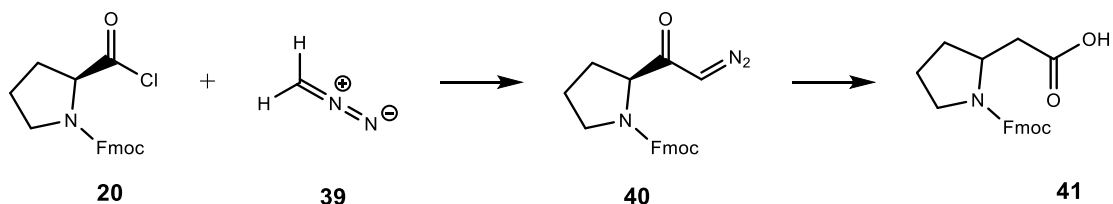
Ambos os métodos realizados originaram crudes que foram purificados por coluna de cromatografia em sílica gel. Utilizou-se como eluente uma mistura de diclorometano e metanol; todas as frações obtidas foram analisadas e verificou-se por ¹H-RMN em CDCl₃ que nenhuma das tentativas originou o composto **32**.

II.2.8 Reação de Arndt-Eistert

Dada a instabilidade demonstrada pelos compostos em estudo e estando descrito na literatura que a instabilidade verificada pode advir tanto das amins como da presença de um carbono ligado a dois heteroátomos na estrutura do composto, decidiu-se testar a remoção do grupo protetor num substrato que não tivesse um carbono ligado a dois heteroátomos.³⁵

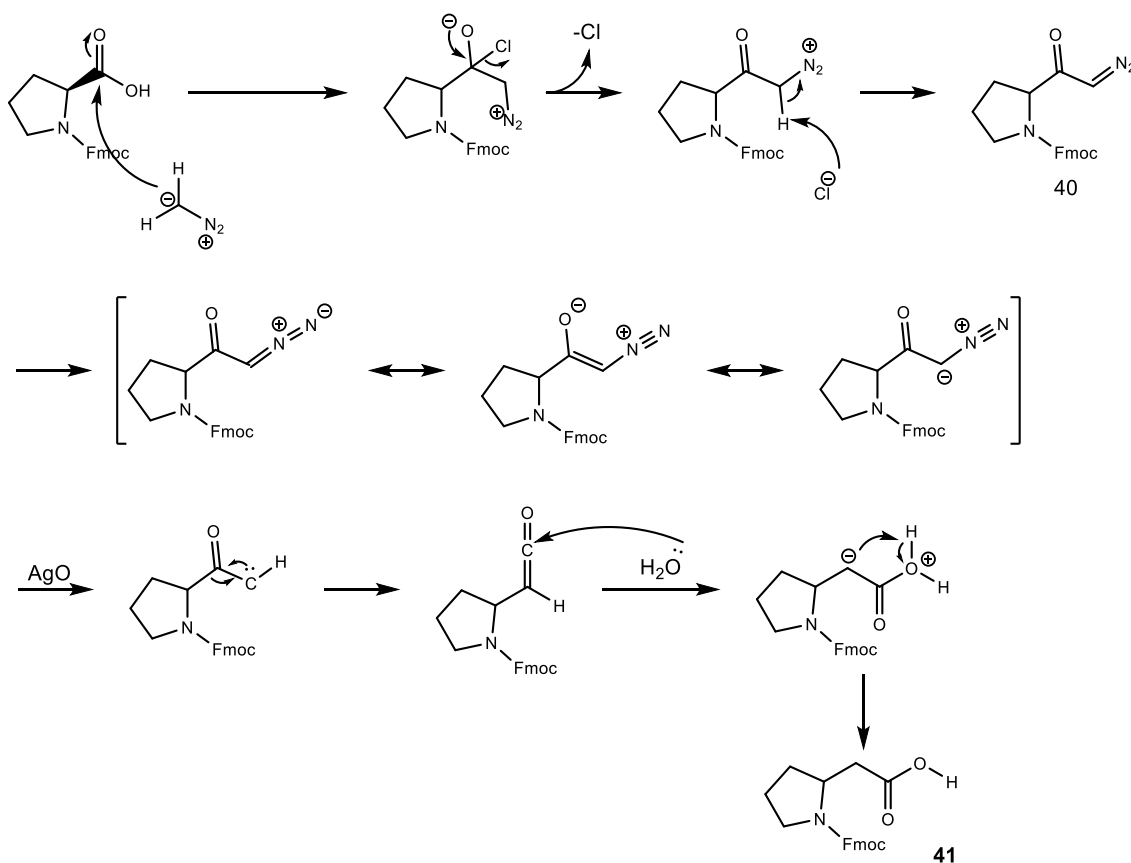
A reação de Arndt-Eistert é uma forma de converter um ácido no seu homologo mais próximo, ou num derivado do ácido homologo. Esta síntese envolve três passos: formação de um cloreto de acilo que por reação com diazometano (**39**) origina uma diazocetona e por fim, esta sofre um rearranjo obtendo-se um ácido, um álcool, um éster ou uma amida, dependendo

do reagente usado no rearranjo.³⁶ Aplicando esta reação ao substrato prolina ficar-se-ia com um análogo em que ao átomo de carbono C-2 apenas estaria ligado um átomo de azoto e poderia a molécula ser mais estável à remoção do Fmoc, era o que se pretendia provar.



Esquema 31 - Reação de Arndt-Eistert.

Assim sendo sintetizou-se o ácido homólogo ao ácido carboxílico da L-prolina, *N*-derivatizada com Fmoc, através da reação de Arndt-Eistert.



Esquema 32 - Mecanismo da reação de Arndt-Eistert

Fez-se reagir composto 9-fluorenilmetil (S)-2-(clorocarbonil)pirrolidina-1-carboxilato (**20**) em diclorometano, com diazometano (**39**). Após a formação da respetiva diazocetona (**40**), adicionou-se tiosulfato de sódio e uma suspensão de prata em água. A reação foi acompanhada por c.c.f. e usou-se como revelador o ácido fosfomolibdico, onde se observou a formação de várias manchas. O *work-up* da reação envolveu a filtração do resíduo de prata (I), a adição de uma solução ácida e de seguida efetuaram-se extrações com éter. Obteve-se um crude que foi purificado por coluna de cromatografia em sílica gel donde se obteve uma mistura entre o composto **40** e **41**. O mecanismo da reação é apresentado no esquema 32.

A mistura obtida foi analisada IV, ¹H-RMN e GC-MS. Através do espectro de IV é possível concluir a presença dos dois compostos. A banda larga entre 3500 e 3060 cm⁻¹ confirma a presença de um grupo hidroxilo, contudo é também possível observar uma banda bastante intensa a 2108 cm⁻¹ respeitante ao grupo diazo.

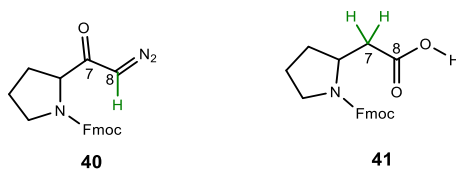


Figura 33 - Estruturas dos compostos obtidos com evidência para a diferença no espectro de ¹H-RMN.

A presença da diazocetona (**40**) pode ser vestigial uma vez que está não é visível no espectro de ¹H-RMN.

De acordo com a literatura o protão do carbono oito da estrutura **40** tem um desvio químico entre δ 5,30 e 4,90 ppm, contudo nessa zona apenas é visível o sinal residual do diclorometano (figura 46)³⁷.

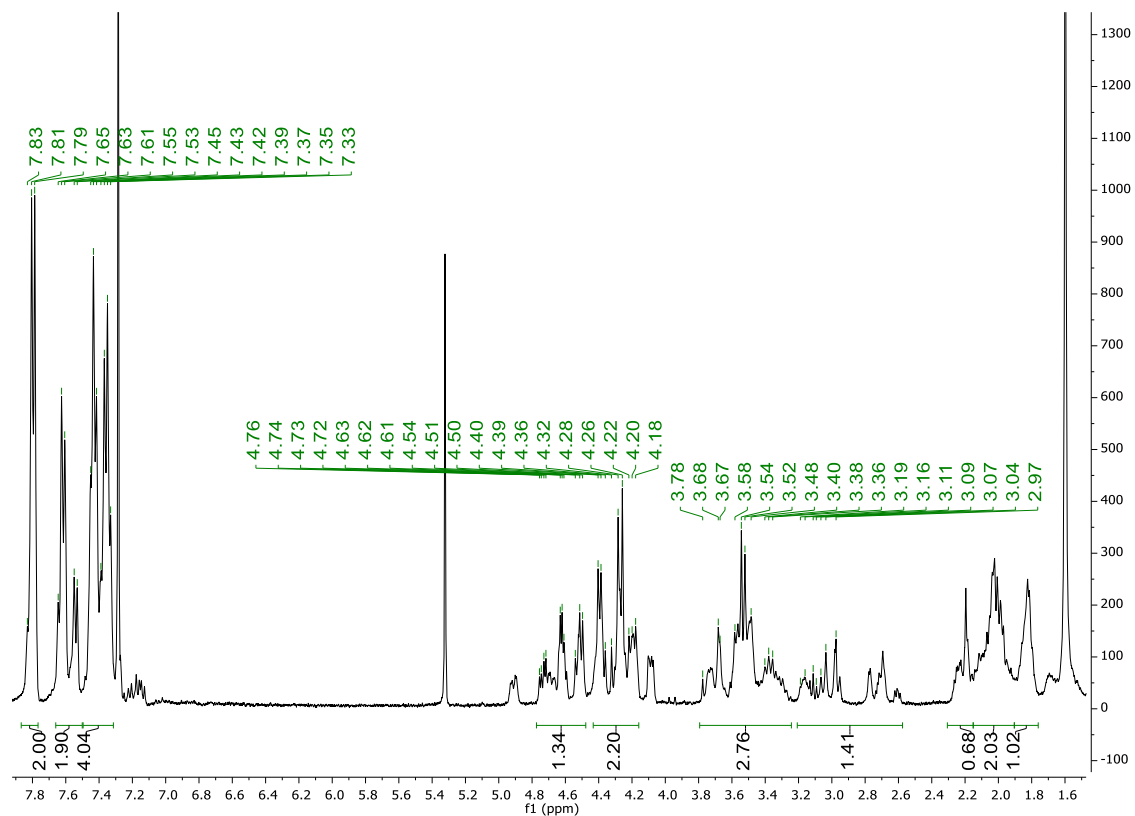


Figura 34 - Ampliação do espectro de ^1H -RMN dos compostos **40** e **41**, realizado em CDCl_3 .

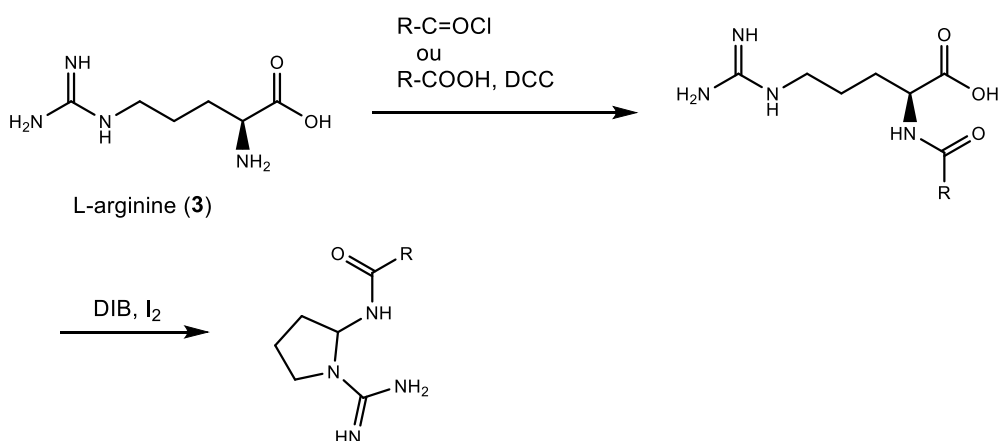
Foi também realizado GC-MS, contudo foi inconclusiva quanto à reação de Arndt-Eistert uma vez que o pico com maior intensidade, com tempo de retenção de 25,81 minutos, corresponde a uma fragmentação do grupo protetor Fmoc (anexo 14).

Devido a limitações de tempo não nos foi possível avançar com a remoção do grupo de proteção Fmoc e verificar a estabilidade do produto formado em comparação com o composto **36**.

II.3 Metodologia adotada partindo da L-arginina

Como já referido, devido à dificuldade de purificação e isolamento, os rendimentos reduzidos e a instabilidade que os compostos derivados da L-prolina apresentaram, foi necessário alterar a estratégia de obtenção de alcaloides possuindo o núcleo aminoguanidina e iniciar uma nova abordagem.

A L-arginina (**3**) constitui um material de partida promissor para a síntese da cernumidina e análogos uma vez que já apresenta na sua estrutura, o grupo funcional guanidina. Esta nova abordagem contém uma via sintética com menos passos de síntese o que pode resultar em rendimentos mais elevados. A via inicia-se com a $N\alpha$ -derivatização da L-arginina, seguida de reação de descarboxilação oxidativa radicalar (esquema 33).



Esquema 33 - Metodologia adotada para a síntese da Cernumidina e análogos partindo da L-arginina.

II.3.1 $N\alpha$ -derivatização da L-arginina

A L-arginina contém na sua estrutura uma amina na posição alfa em relação ao ácido, que facilmente pode ser derivatizada de modo a originar compostos de interesse para o estudo. No decorrente estudo funcionalizou-se a amina através de dois métodos. O primeiro envolve a reação de um cloreto de acilo e a L-arginina e no segundo método fez-se reagir ácidos carboxílicos com a L-arginina, mediados por um agente de acoplamento (esquema 33).

II.3.1.1 Reações entre cloretos de acilo e a L-arginina

Muitos dos compostos com o grupo funcional cloreto de acilo, podem ser adquiridos comercialmente, no entanto este grupo funcional pode também ser obtido facilmente obtido por

vários procedimentos. Nesta metodologia usaram-se dois compostos com este grupo funcional, o cloreto de benzoilo adquirido comercialmente e o cloreto de (4-metoxifenil)acrilóilo (**42**) formado a partir do respectivo ácido.

A formação do cloreto (4-metoxifenil)acrilóilo (**42**) foi efetuada através da reação entre o ácido 4-metoxicinâmico e o cloreto de tionilo, sem solvente. O *work-up* da reação apenas envolve a evaporação à pressão reduzida dos compostos voláteis formados durante a reação e do excesso de cloreto de tionilo. O mecanismo desta reação está representado no esquema 19, do capítulo II.2.2.2.

Através do método descrito foi possível obter o composto cloreto de (4-metoxifenil)acrilóilo (**42**) com rendimento de 99,86%. A confirmação da sua estrutura foi realizada através de IV onde é possível observar a ausência da banda larga respeitante ao grupo OH do grupo ácido carboxílico. As bandas dos restantes grupos funcionais da molécula encontram-se visíveis no espectro, sendo que a banda a 1599 cm^{-1} é respeitante à vibração das ligações C=C presentes, a banda a 1733 cm^{-1} corresponde ao carbonilo do cloreto de acilo. O alongamento C_{sp3}-H do grupo metilo corresponde às bandas 2966 e 2937 e 2842 cm^{-1} (figura 35).

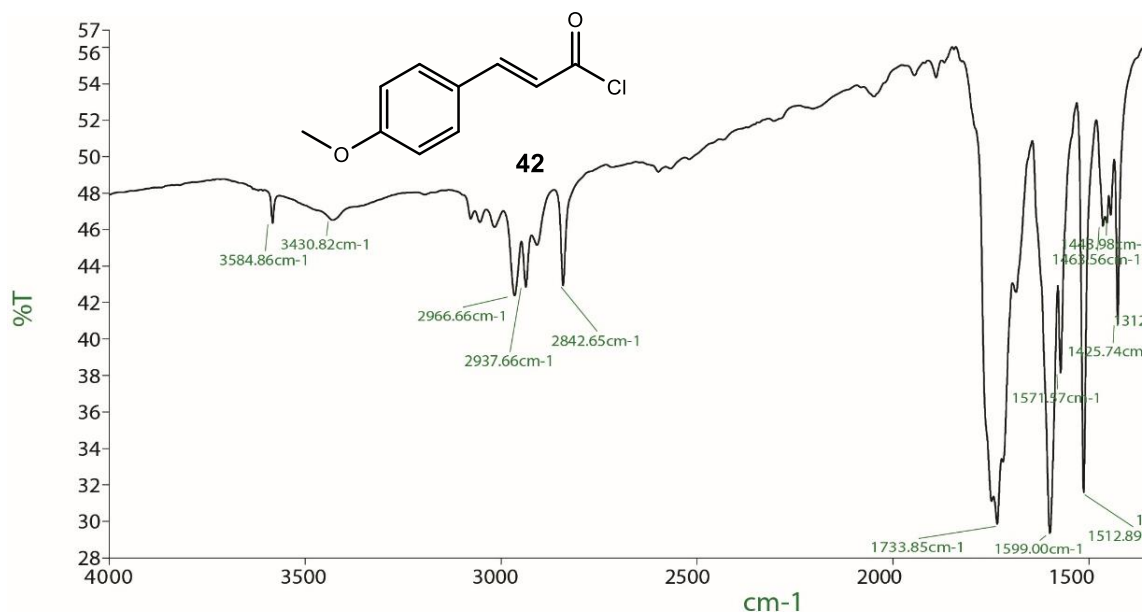
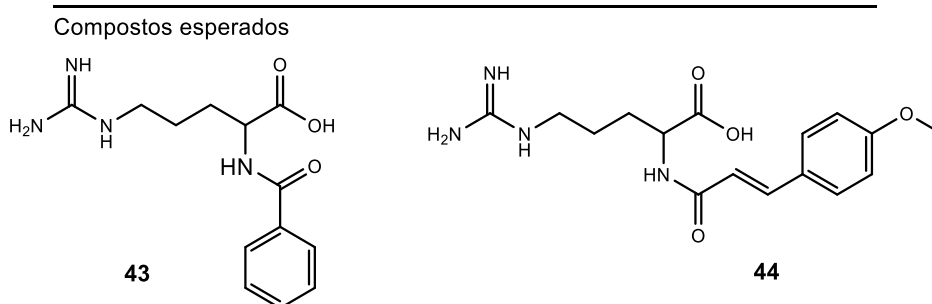
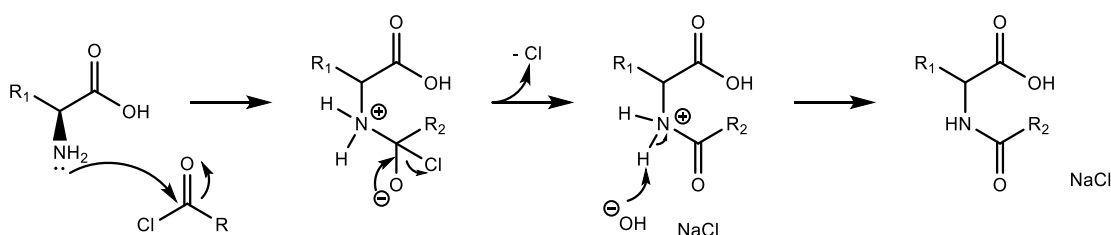


Figura 35 - Espectro de IV do composto **42**, realizado em filme em discos de NaCl.

As reações de *N* α -derivatização da L-arginina com cloretos de acilo decorreram em meio aquoso básico e foram acompanhadas por c.c.f. com revelação com ninidrina e reagente de Dragendorff onde se observou o desaparecimento do material de partida e o aparecimento de uma nova mancha. O *work-up* envolveu acidificação do meio reacional, de modo a precipitar

restos de material de partida que não tenha reagido, posteriormente removidos por filtração. O filtrado foi lavado com éter etílico de modo a garantir toda a remoção de cloreto de acilo ou respectivo ácido carboxílico, que não reagiu. A fase aquosa foi basificada até pH 8 e evaporada à secura. O crude obtido foi purificado por uma coluna de cromatografia com sílica RP-18, eluição com misturas de água e metanol, no sentido de diminuir a polaridade das misturas.



Esquema 34 - Mecanismo da reação entre aminas e cloretos de acilo e representação das estruturas dos compostos obtidos.

O composto **43** ($N\alpha$ -benzoil-arginina) foi obtido com rendimento de 60,16% e foi caracterizado através de IV e ^1H -RMN em D_2O . A análise do espectro de IV confirma a presença dos grupos funcionais esperados, nomeadamente, a banda larga entre 3600 e 2900 cm^{-1} correspondente ao grupo hidroxilo, a banda a 3217 cm^{-1} é respeitante às vibrações N-H da amida formada, as bandas a 3054 e 3025 cm^{-1} correspondem aos alongamentos das ligações $\text{C}_{\text{sp}^2}\text{-H}$ do sistema aromático. Os dois grupos carbonilo correspondem às bandas a 1680 e 1622 cm^{-1} ; a banda 1595 cm^{-1} corresponde à ligação N-H da amida e a banda a 1548 cm^{-1} é respeitante às ligações $\text{C}=\text{C}$ do anel aromático.

O espectro de ^1H -RMN confirma a formação do composto esperado, nomeadamente pelos sinais a campo baixo, mais propriamente o duplete a $\delta\ 7,83\text{ ppm}$ com integração para dois prótons, e os dois tripletos a $\delta\ 7,66$ e $7,55\text{ ppm}$ com integrações para um e dois prótons, respetivamente. Esta zona aromática apresenta integração total para cinco prótons, respeitantes aos prótons presentes no anel aromático da estrutura esperada; também o duplo duplete a $\delta\ 4,4$

ppm correspondente ao próton do átomo de carbono C-2 que é característico deste composto (figura 36).

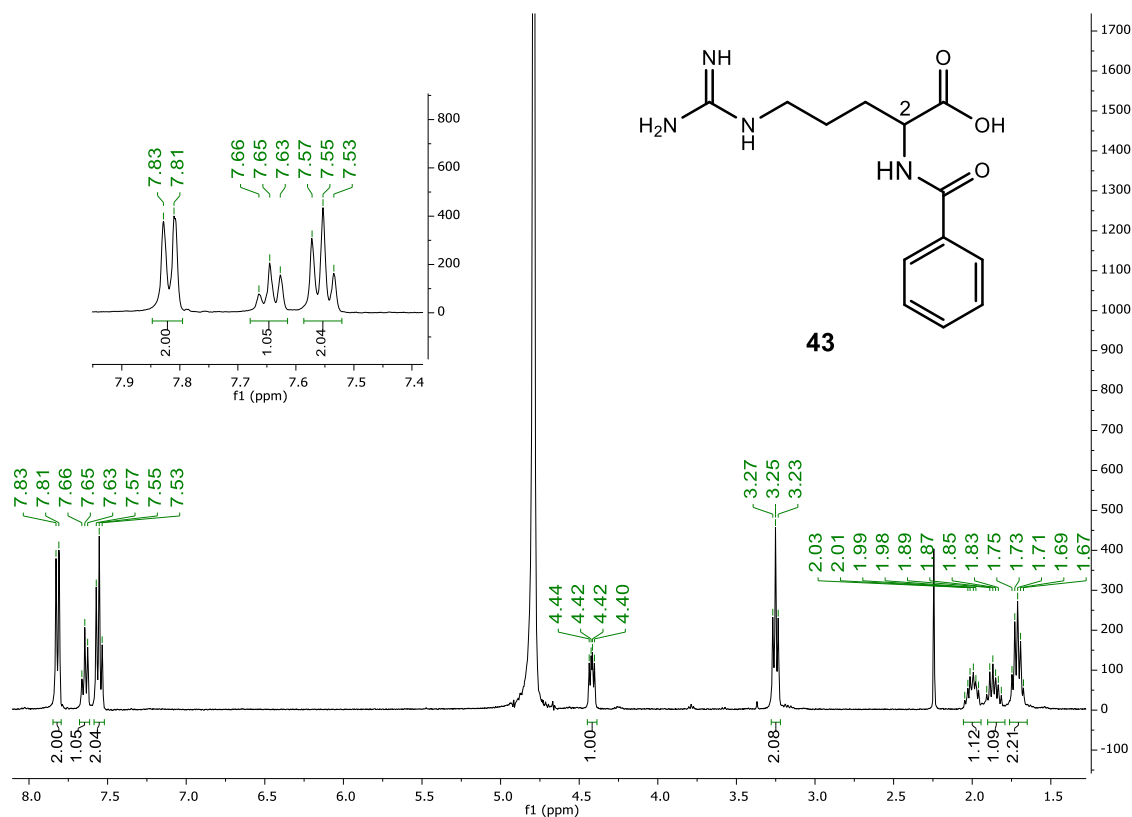


Figura 36 - Espectro de ¹H-RMN do composto **43**, realizado em D₂O, com respectiva expansão da zona aromática.

A reação entre o composto cloreto (4-metoxifenil)acrilóilo (**42**) e a L-arginina originou os compostos (*E*)-(3-(4-metoxifenil)acrilóil)-L-arginina (**44**) e (*Z*)-(3-(4-metoxifenil)acrilóil)-L-arginina (**45**) numa proporção de 1:0,6. A mistura foi analisada por IV, ¹H-RMN em D₂O e LC-MS.

O espectro de IV apresenta os grupos funcionais esperados. É possível observar a banda entre 3600 e 2600 cm⁻¹ respeitante ao grupo hidroxilo, a banda a 3357 cm⁻¹ corresponde às vibrações N-H do grupo amida presente na molécula, as bandas a 1656 e 1602 cm⁻¹ que correspondem aos dois grupos carbonilo.

O espectro de ¹H-RMN é mais conclusivo quanto à formação do composto **44**. A campo baixo é possível visualizar sinais respeitantes ao anel aromático, mas também à dupla ligação presente na estrutura da molécula. Os dupletos a δ 7,59 e 7,03 ppm com integração total para quatro prótons são respeitantes aos prótons do anel aromático, já os dupletos a δ 7,49 e 6,54 ppm com constantes de acoplamento de 15,8 Hz e integração total para dois prótons são correspondentes aos prótons da ligação α,β-insaturada. A campo alto é possível verificar a presença de um singuleto a δ 3,86 ppm com integração para três prótons correspondentes aos

do grupo metoxilo. Como já tem vindo a ser referido, para esta família de compostos, o multipletto de δ 4,34 a 4,30 ppm, com integração para um protão, é característico do protão do átomo de carbono 2 (figura 37).

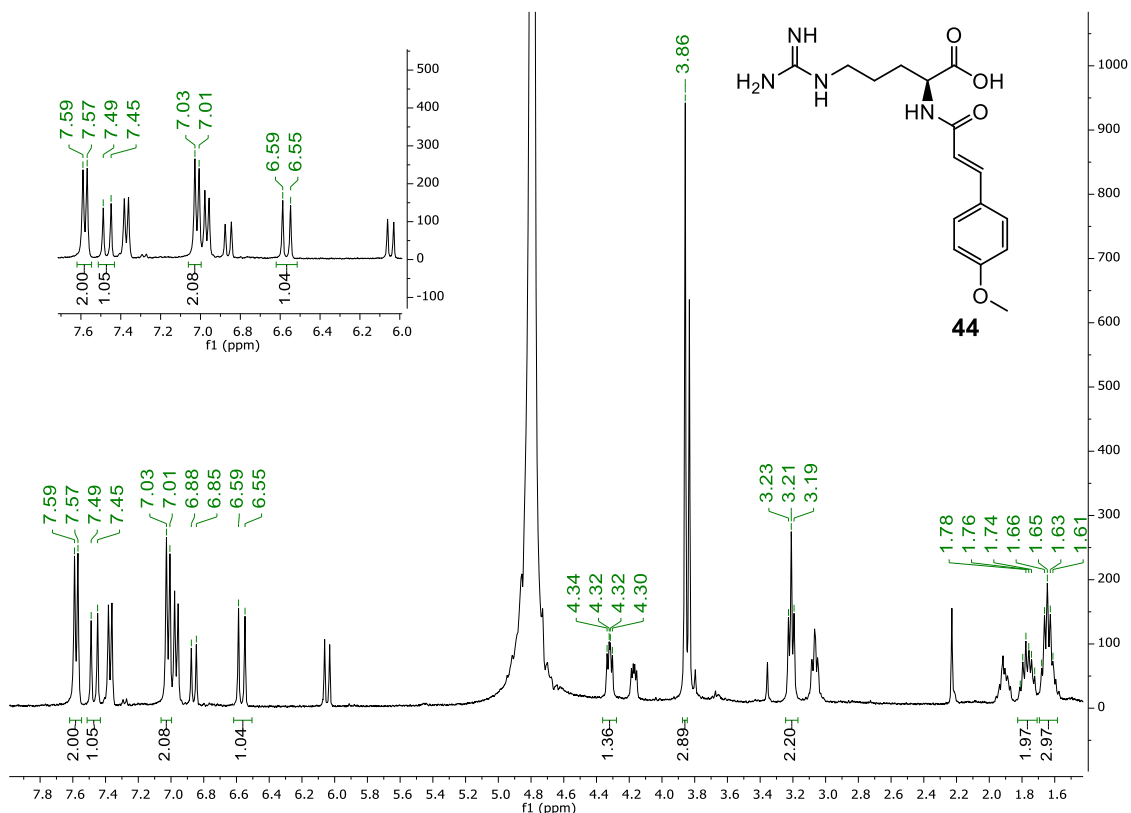


Figura 37 - Espectro de ^1H -RMN dos compostos **44** e **45**, efetuado em D_2O , com expansão da respetiva zona aromática e identificação e integração dos sinais para o composto **45**.

O isómero *cis* ((*Z*)-3-(4-metoxifenil)acrilóil)-L-arginina, **45**) é perfeitamente identificável no espectro de ^1H -RMN através dos dois dupletos a δ 6,87 e 6,06 ppm, com constante de acoplamento de 12,3 Hz (figura 38). É também possível observar alterações nos desvios químicos dos restantes sinais, como é o caso do multipletto de δ 4,19 a 4,15 ppm, respeitante ao protão do átomo de carbono 2 assim como o singuleto a δ 3,83 ppm correspondente ao grupo metoxilo.

O espectro de LC-MS confirma a formação dos compostos pois apresenta um pico a m/z 335,2 $[\text{M}+\text{H}]^+$ respeitante à molécula protonada e o sinal a m/z 669,3 correspondente ao dímero protonado $[\text{2M}+\text{H}]^+$ (anexo 15).

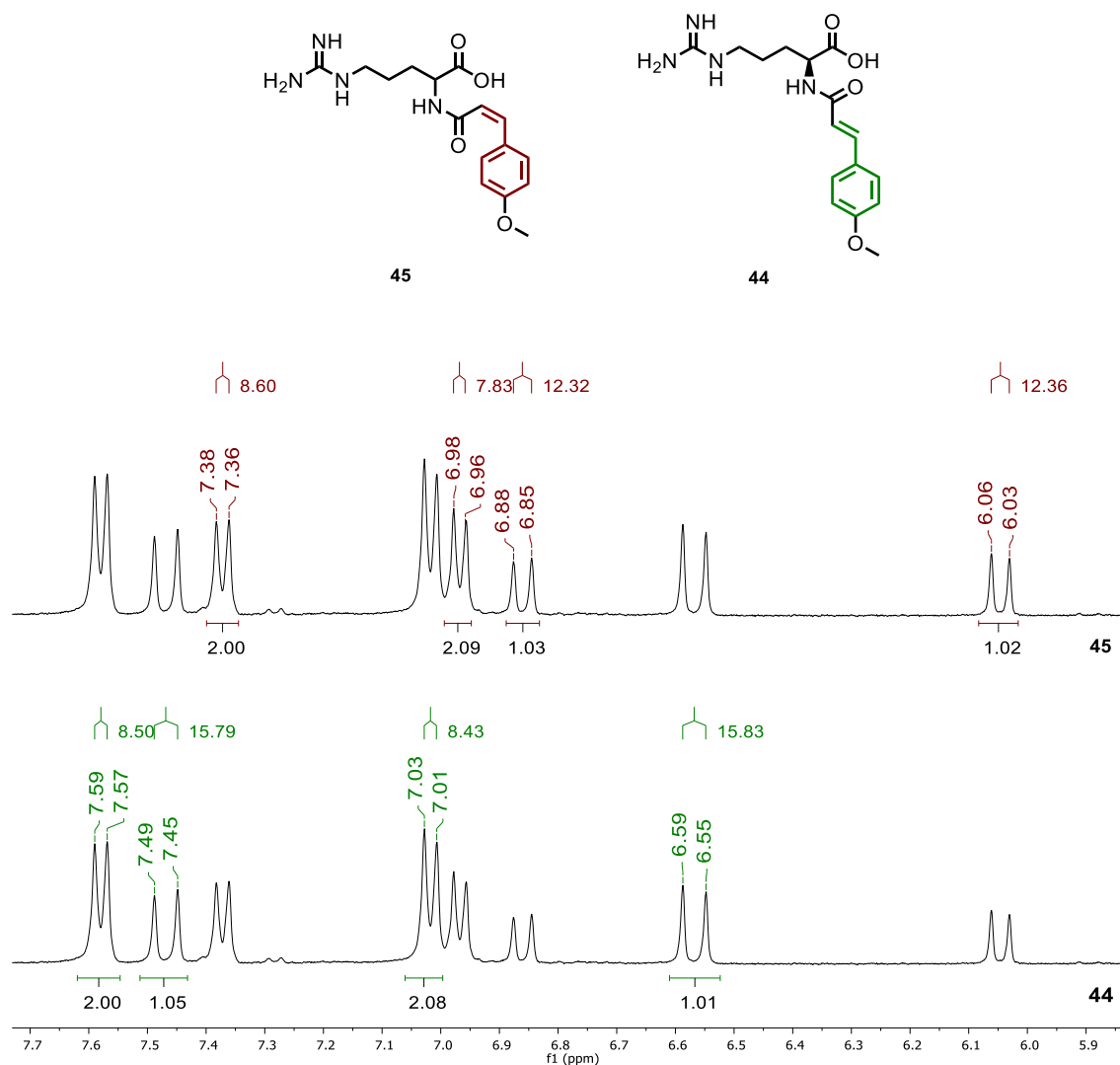


Figura 38 – Ampliação, na zona aromática, do espectro de ¹H-RMN dos compostos **44** e **45**, com respectivas identificação de sinais de próton, integração e representação da estruturas químicas.

II.3.1.2 Reações entre ácidos carboxílicos e a L-arginina

A reação entre ácidos carboxílicos e aminas é possível desde que o ácido carboxílico esteja ativado com um bom grupo abandonante. Uma das formas de ativar ácidos carboxílicos é através do uso de agentes de acoplamento. No estudo em questão utilizaram-se três ácidos carboxílicos o ácido 4-metoxibenzóico (**46**), o ácido 3-hidroxi-4-metoxibenzóico (**47**) e o ácido isoferúlico (**48**) representados na figura 39.

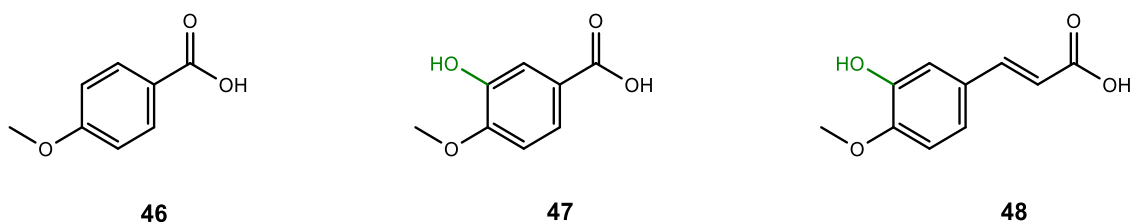


Figura 39 - Estrutura dos ácidos carboxílicos usados na $N\alpha$ -derivatização da L-arginina, através de reações mediadas por agentes de acoplamento.

O ácido 3-hidroxi-4-metoxibenzoico (**47**) e o ácido isoferulico (**48**) apresentam na sua estrutura um grupo hidroxilo que têm de ser protegido para que não interfira na reação, mas também para que não perca a sua funcionalidade. Estão descritos na literatura vários métodos de proteção do grupo hidroxilo, neste estudo utilizou-se bromo metoximetano (MOMBr), de forma a proteger seletivamente o grupo hidroxilo do anel aromático dos ácidos **47** e **48**.

Os respetivos ácidos reagiram com MOMBr em THF, na presença de trietilamina. As reações foram acompanhadas por c.c.f. e usou-se como revelador o iodo, tendo-se observado o gradual desaparecimento da mancha respeitante ao material de partida e o aparecimento de uma nova mancha correspondente ao produto. O *work-up* da reação envolveu a adição de celite, evaporação do THF e lavagens com *n*-hexano. Foram obtidos os respetivos produtos, o ácido 4-metoxi-3-(metoximetoxi)benzoico (**49**) e o ácido (*E*)-3-(3-metoxi-4-(metoximetoxi)fenil) acrílico (**50**).

O composto ácido 4-metoxi-3-(metoximetoxi)benzoico (**49**) foi obtido com rendimento de 35,05% e a sua estrutura foi confirmada por ^1H -RMN através dos sinais a δ 3,53 e 3,94 ppm com integração total para seis prótons respeitantes aos dois grupos metilo e a δ 5,44 ppm com integração para dois prótons correspondentes aos dois prótons do átomo de carbono 8 (figura 40)

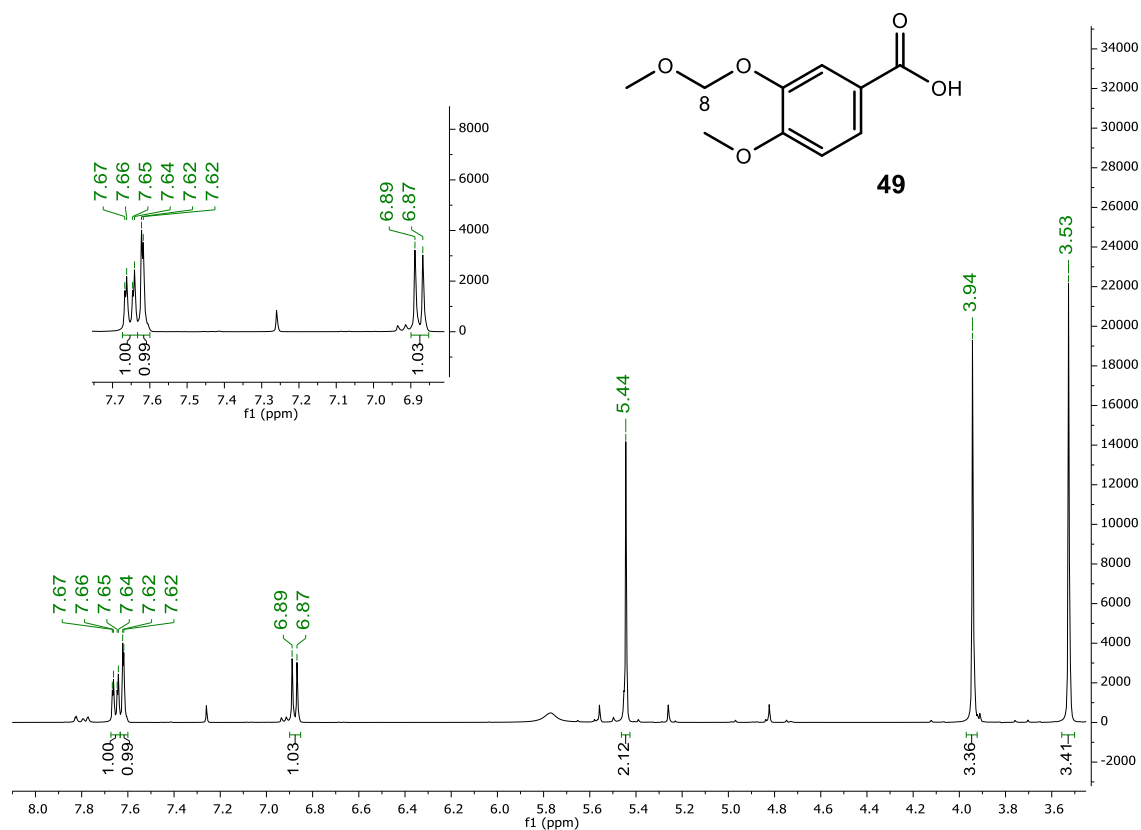


Figura 40 - Espectro de ^1H -RMN do composto **51**, realizado em CDCl_3 , com respectiva expansão da zona aromática.

O ácido (*E*)-3-(4-metoxi-3-(metoximetoxi)fenil)acrílico (**50**) foi obtido com rendimento de 63,82% e o espectro de ^1H -RMN evidência a estrutura obtida através dos singletos a δ 3,69 e 3,49 ppm com integração total para seis prótons respeitantes aos dois grupo metilo e a δ 5,34 ppm com integração para dois prótons correspondentes aos dois prótons do átomo de carbono 7 (figura 41).

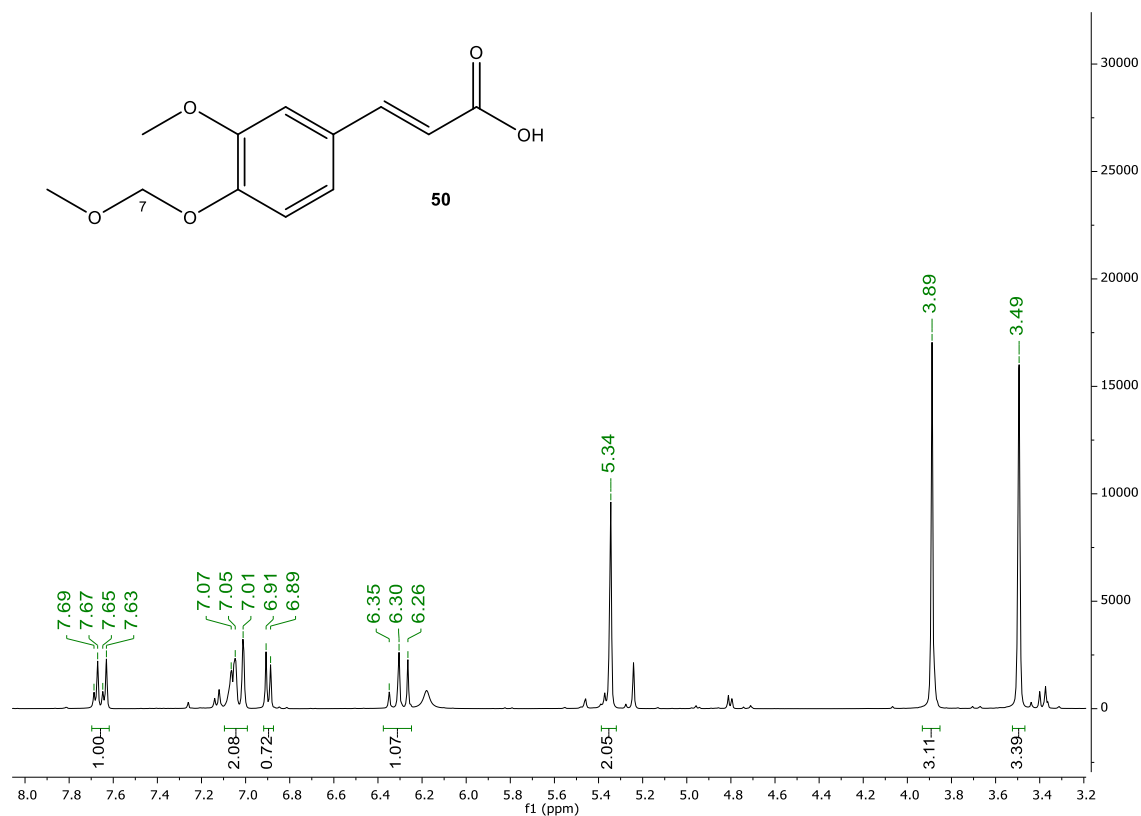
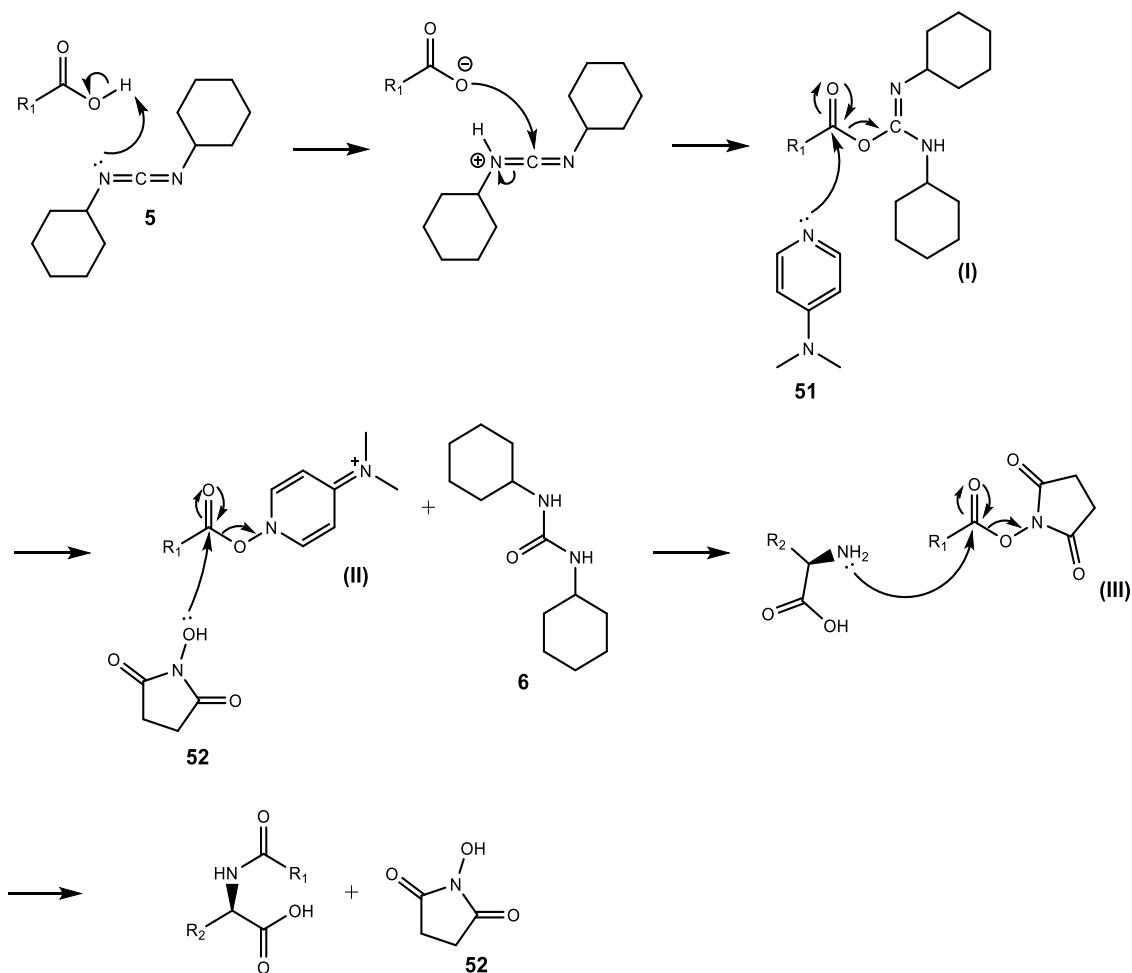


Figura 41 - Ampliação do espectro de ¹H-RMN do composto **50**, realizado em CDCl₃.

As reações de *N*α-derivatização da L-arginina com ácidos carboxílicos decorreram em diclorometano e o agente de acoplamento utilizado foi o DCC. A reação foi acompanhada por c.c.f. revelação com reagente de Dragendorff e após a verificação do consumo do respetivo ácido carboxílico, adicionou-se DMAP em quantidade catalítica e *N*-hidroxi-succinimida que substitui o DCC no acoplamento, eliminando o DCU, que é removido por filtração. A adição da L-arginina origina os respetivos produtos e regenera a *N*-hidroxi-succinimida. O *work-up* da reação apenas envolve a evaporação à pressão reduzida dos solventes orgânicos. Posteriormente o crude sofreu purificação por coluna de cromatografia em sílica RP-18 usando como eluente misturas de água-metanol, por ordem decrescente de polaridade. As frações obtidas foram analisadas por UV.

O mecanismo reacional, compreende quatro passos. No primeiro passo o oxigénio do carbonilo ataca o carbono central do DCC (**5**), de seguida o DMAP (**51**) ataca nucleofilicamente o carbono do carbonilo do intermediário (**I**) formado e a reconstituição do carácter duplo da ligação oxigénio-carbono elimina o DCU (**6**), formando assim o intermediário (**II**), que sofre um ataque nucleofílico por parte da *N*-hidroxi-succinimida (**52**). A reconstituição do carácter duplo da ligação carbono-oxigénio forma o intermediário (**III**) e regenera o DMAP (**51**). Por fim adiciona-se a L-arginina cuja amina ataca nucleofilicamente o carbono do carbonilo do intermediário (**III**). A

reconstituição desta dupla ligação regenera a *N*-hidroxi-succinimida (**52**) e origina os respectivos produtos (esquema 35).



Esquema 35 - Mecanismo reacional da reação entre ácidos carboxílicos e aminas, mediado por CDD/NHS.

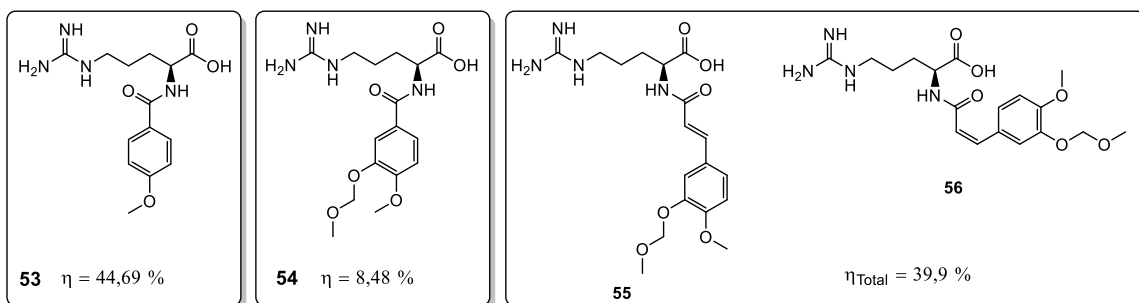


Figura 42 - Representação dos produtos obtidos através da reação entre ácidos carboxílicos e aminas, e respectivos rendimentos.

O composto (4-metoxibenzoil)arginina (**53**) foi obtido com rendimento de 44,69%. O espectro de IV correspondente apresenta bandas respeitantes de grupos funcionais esperados, nomeadamente a banda larga entre 3600 e 2500 cm^{-1} correspondente ao grupo hidroxilo e as bandas a 1631 e 1607 cm^{-1} correspondem aos grupos carbonilo. A banda N-H da amida não é visível uma vez que as amidas absorvem na mesma frequência que os grupos hidroxilo, contudo, com uma intensidade menor, pelo que a banda do grupo hidroxilo pode ter-se sobreposto à banda da amida.

A confirmação da formação do composto **53** é dada pelo espectro de ^1H -RMN através dos sinais a campo baixo respeitantes ao sistema aromático, nomeadamente pelos dois dupletos a δ 7,78 e 6,88 ppm com integração total para quatro prótons respeitantes aos prótons do anel aromático *p*-substituído. Outra evidência é o duplete de dupletos a δ 4,45 ppm com integração para um próton respeitante ao próton do átomo de C-2. O singuleto a δ 3,79 ppm, com integração para três prótons correspondente ao grupo metilo que também evidencia a estrutura do composto obtido. Os sinais do núcleo pirrolidina estão também presentes e são característicos pelos multipletos apresentados tal como já referido anteriormente (figura 43).

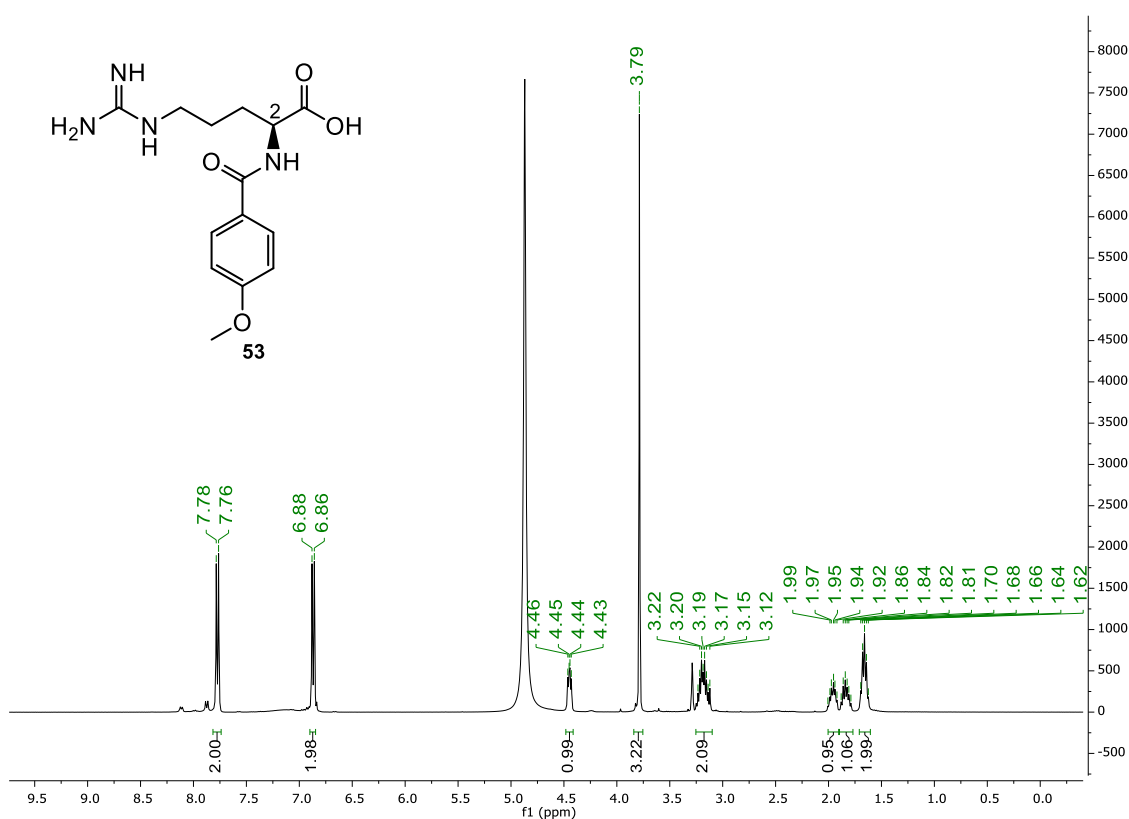


Figura 43 - Espectro de ^1H -RMN do composto (4-metoxibenzoil)arginina (**53**), obtido em MeOD.

O espectro de LC-MS também confirma a formação do composto através do pico a m/z 309 respeitante à molécula protonada $[M+H]^+$ e ao pico a m/z 617 respeitante ao dímero protonado $[2M+H]^+$ (anexo 16).

O composto (4-metoxi-3-(metoximetoxi)benzoil)arginina (**54**) foi obtido com rendimento de 8,48%. A presença de todos os grupos funcionais esperados no espectro de IV, inclusive a banda da amida a 3329 cm^{-1} confirma a obtenção do composto **54**. O espectro de ^1H -RMN evidência a sua formação através do singuleto a δ 5,75 ppm com integração para um protão, respeitante ao protão da amida e dos dois singuletos a δ 3,96 e 3,53 ppm, com integração total para seis protões, correspondentes aos dois grupos metilo. A zona aromática também evidencia a formação do composto **54** através do duplete de dupletos a δ 7,66 ppm e os dupletos a δ 7,63 e 6,90 ppm com integração total para três protões respeitantes aos protões do anel aromático e ao sinal a δ 4,1 ppm, com integração para um protão correspondente ao protão do átomo de carbono C-2 (figura 44).

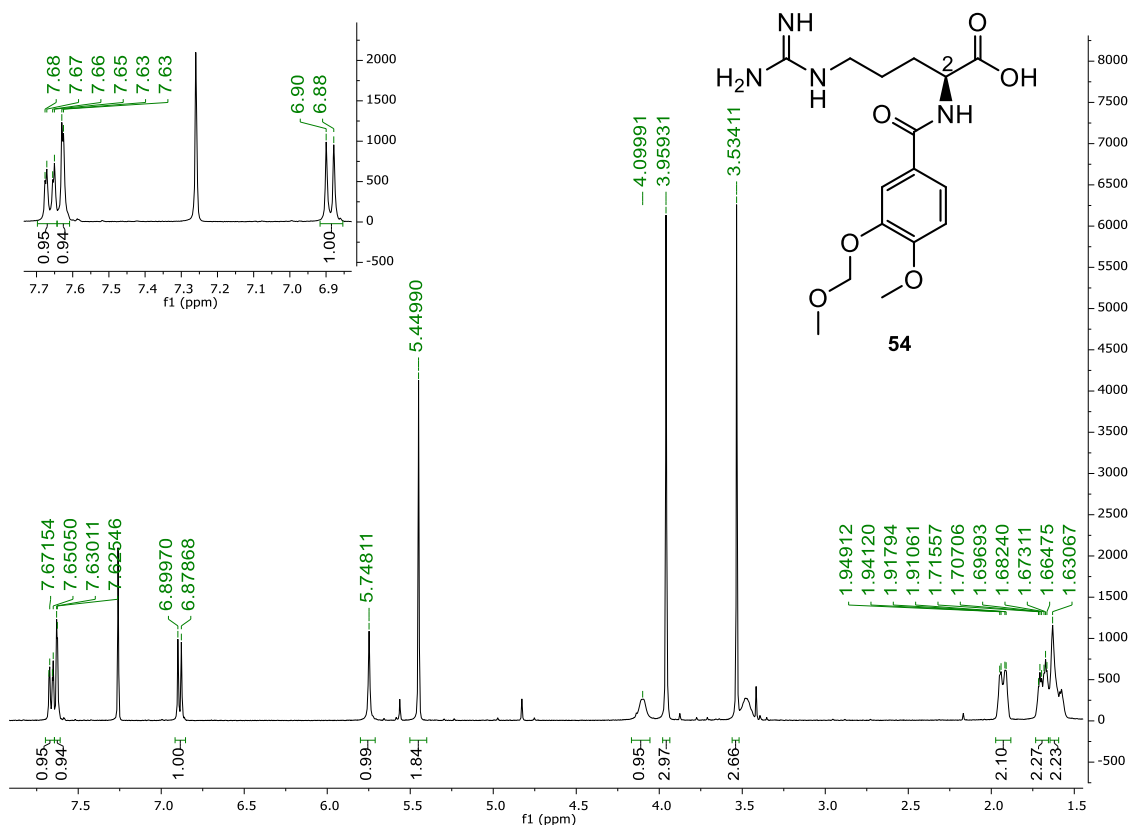


Figura 44 - Espectro de ^1H -RMN do composto **54**, efetuado em CDCl_3 , com respetiva expansão na zona aromática.

A reação entre o composto **50** ((*E*)-3-(4-metoxi-3-(metoximetoxi)fenil)acrílico) e a L-arginina com recurso ao agente de acoplamento DCC, originou o produto esperado (*E*)-3-(4-metoxi-3-(metoximetoxi)fenil)acryloil)arginina (**55**) e o seu isómero *cis* (*Z*)-3-(4-metoxi-3-(metoximetoxi)fenil)acryloil)arginina (**56**) numa proporção de 1:0,46.

Por ^1H -RMN é possível confirmar a presença do composto **55** através dos dois singletos a δ 3,88 e 3,48 ppm, com integração total para seis protões, correspondentes aos dois grupos metilo, mas também pelos sinais presentes na zona aromática. A campo baixo é possível observar os dois sinais correspondentes aos protões da insaturação, o multiplete de δ 7,2 a 7,12 ppm e um duplete a δ 6,49 ppm, com constante de acoplamento de 15,9 Hz e com integração total para dois protões (figura 45).

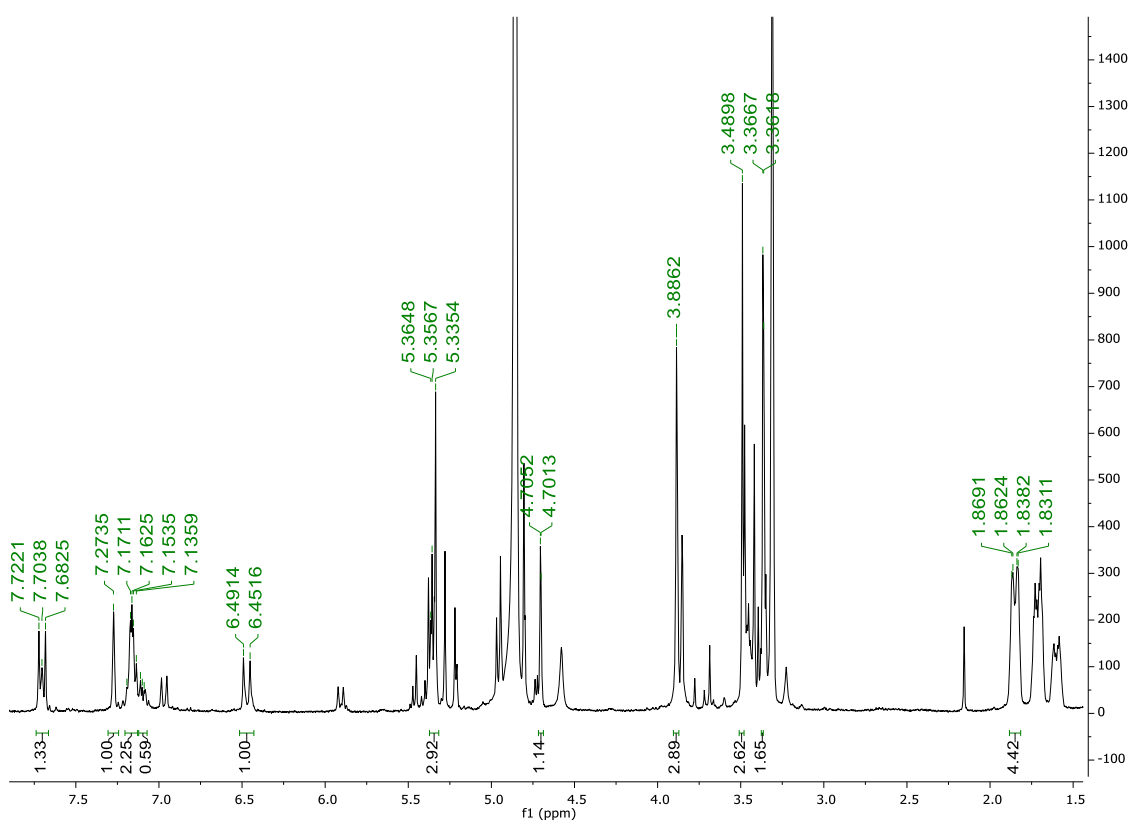


Figura 45 - Ampliação do espectro ^1H -RMN do composto **55**, efetuado em MeOD.

A campo alto é ainda possível verificar a presença de três dupletos de dupletos e dois multipletos, com integração total para vinte e cinco protões. Acredita-se que sejam respeitantes aos protões do composto DDC, um material de partida da reação que pode não ter reagido na sua totalidade, e aos protões respeitantes à pirrolidina dos compostos **55** e **56**. Dada a complexidade não é possível atribuir inequivocamente os protões das estruturas **55** e **56** aos multipletos observados no espectro de ^1H -RMN (figura 45).

A formação do isômero *cis* é evidenciada através dos dois dupletos, a campo baixo, a δ 6,96 e 5,92 ppm, cada um com uma constante de acoplamento de 12,4 Hz. O aumento, em geral, da integração do espectro representado na figura também evidencia a formação do isômero (figura 46).

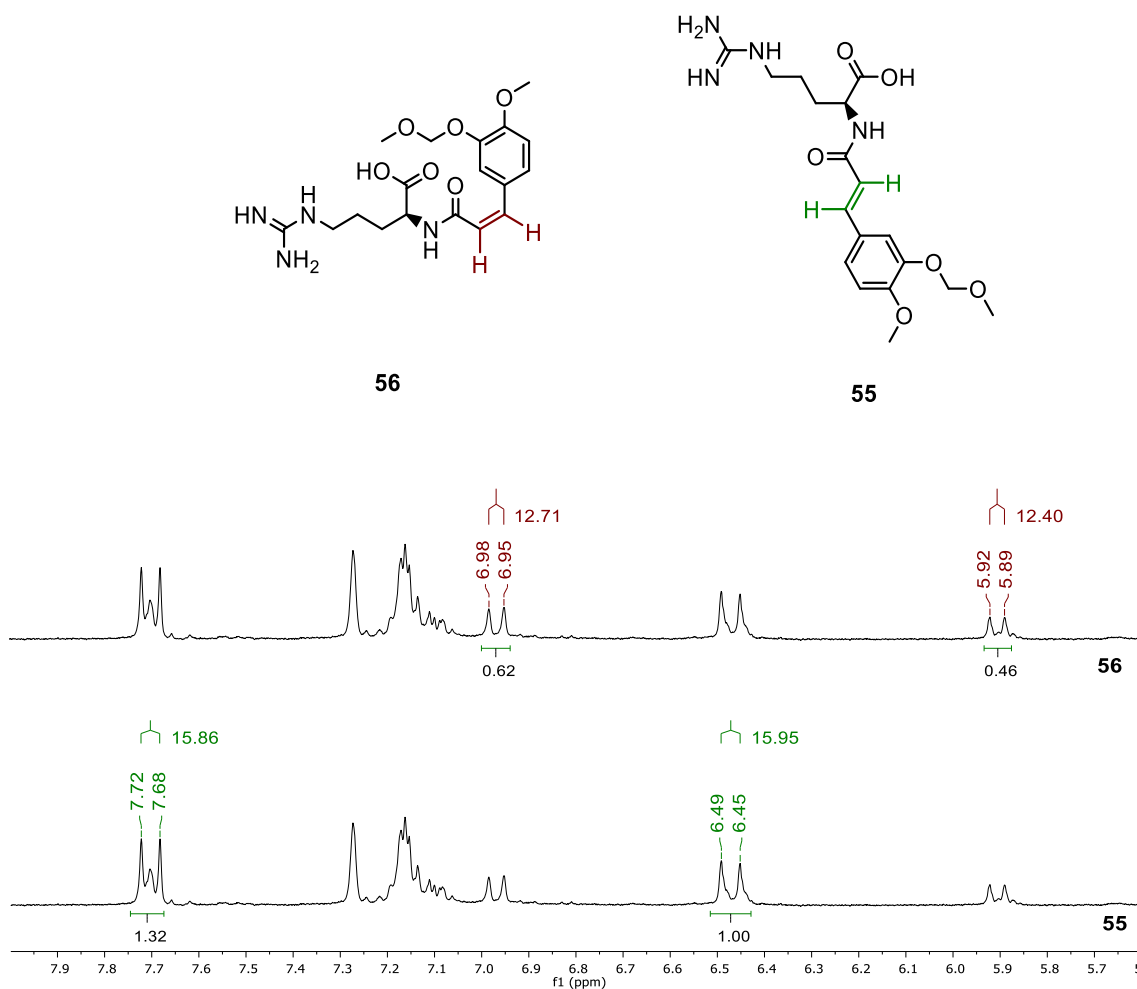
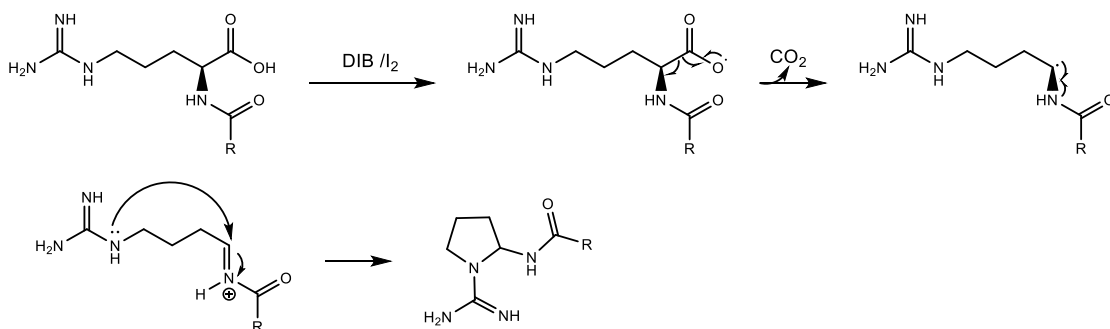


Figura 46 - Ampliação, na zona aromática, do espectro de ^1H -RMN dos compostos **55** e **56**, com respectivas identificação de sinais de próton, integração e representação da estruturas químicas.

II.3.2 Descarboxilação oxidativa

Com o objetivo de ciclar a L-arginina realizaram-se reações de descarboxilação oxidativa radicalar com DIB na presença de iodo. As reações foram acompanhadas por c.c.f. e usou-se reagente de Dragendorff como revelador, onde se observou o aparecimento de várias manchas indicando a formação de uma mistura complexa. O *work-up* da reação envolveu evaporação do solvente a pressão reduzida e sucessivas lavagens do crude com diclorometano com o objetivo de remover o iodobenzeno formado na reação assim como produtos menos polares, de seguida

o crude foi purificado por cromatografia em coluna de sílica RP-18, tendo como eluente misturas de água-metanol por ordem decrescente de polaridade das misturas. As frações foram analisadas por UV, foram juntas as frações que apresentaram o mesmo perfil no UV e posteriormente estas foram evaporadas à secura. Os compostos obtidos foram analisados por IV, ^1H -RMN MeOD e por LC-MS.



Esquema 36 - Mecanismo da descarboxilação oxidativa radicalar.

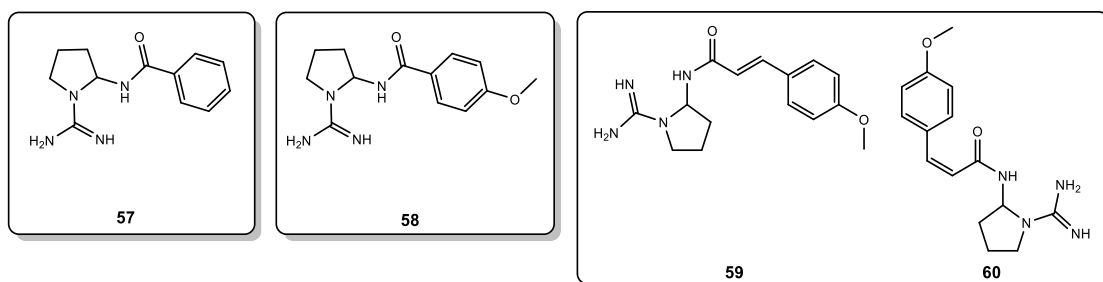


Figura 47 - Representação dos compostos obtidos através das reações de descarboxilação oxidativa radicalar.

De modo a compreender as melhores condições reacionais para a reação de descarboxilação oxidativa, a reação de descarboxilação oxidativa do composto **43** (N_α -Benzoil-L-arginina) foi efetuada quatro vezes com alterações no tempo ou no *work-up* da reação.

Aumentou-se o tempo de reação com o objetivo de que a reação fosse o mais completa possível, contudo o consumo completo do material de partida não foi observado em nenhum dos ensaios. Também não foi possível isolar completamente o produto esperado, a *N*-(1-carbamimidopirrolidina-2-il)benzamida (**57**) do material de partida (N_α -Benzoil-L-arginina, **43**), uma vez que estes têm uma estrutura química extremamente semelhante o que consequentemente leva a afinidades químicas bastante idênticas (tabela 1).

Tabela 1 - Condições experimentais adotadas na reação de descarboxilação oxidativa do composto **43**; nos métodos de purificação a coluna de cromatografia foi realizada com sílica RP-18; as extrações referem-se a lavagens do crude com metanol e diclorometano.

Entrada	Tempo de reação	Métodos de purificação	Resultados obtidos
A	3h30min	Coluna de cromatografia	mistura entre material de partida (43) e o composto esperado (57)
B	24h	Coluna de cromatografia	
C	27h	Coluna de cromatografia	presença vestigial de material de partida (43) e o composto esperado (57)
D	48h	Extrações	

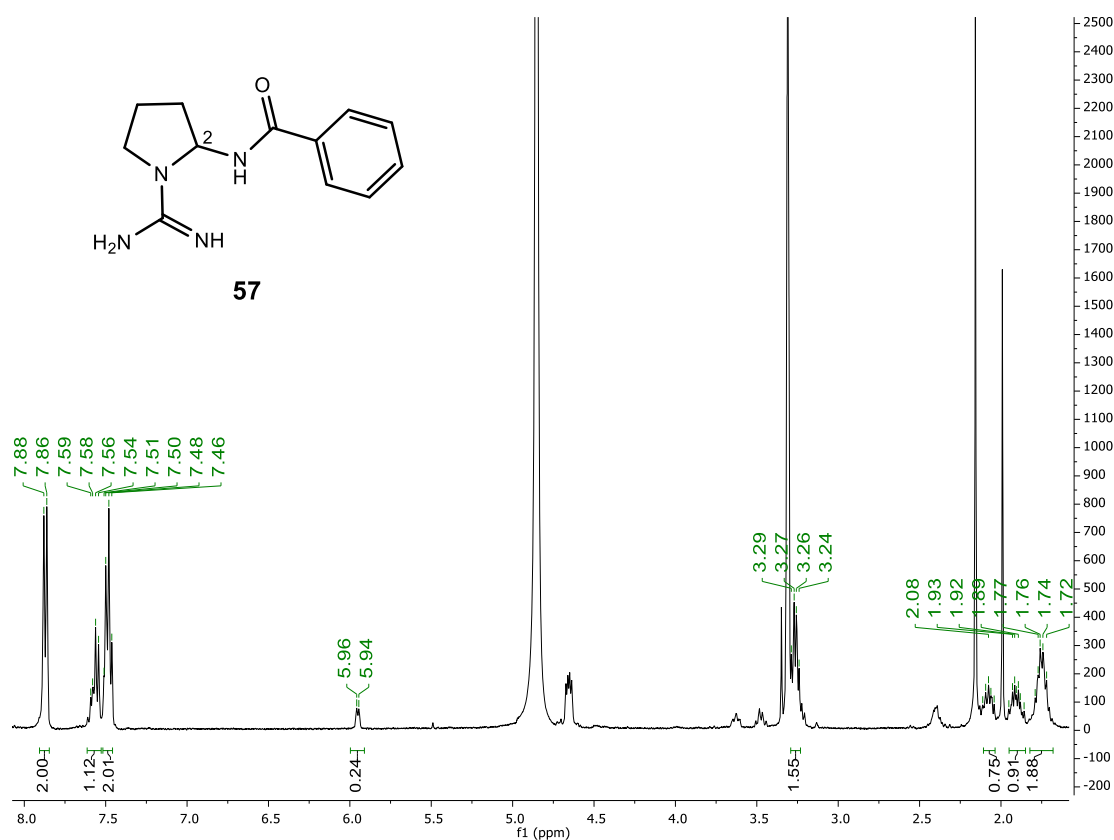


Figura 48 - Espectro de ^1H -RMN para o composto **57**, entrada **D** - tabela 2.

A maior evidência para a formação do composto **57** é o sinal a δ 5,96 ppm correspondente ao próton do átomo de carbono 2. A presença de material de partida (*N*-alfa-benzoil-arginina, **43**)

é confirmada pelo multipletto a δ 4,66 ppm correspondente ao próton do átomo de carbono 2 (figura 48).

O espectro de LC-MS confirma a presença dos dois produtos através do pico a m/z 233 respeitante ao composto **57** protonado $[M+H]^+$ e do sinal m/z 279 correspondente ao material de partida (**43**) protonado $[M+H]^+$ (figura 49).

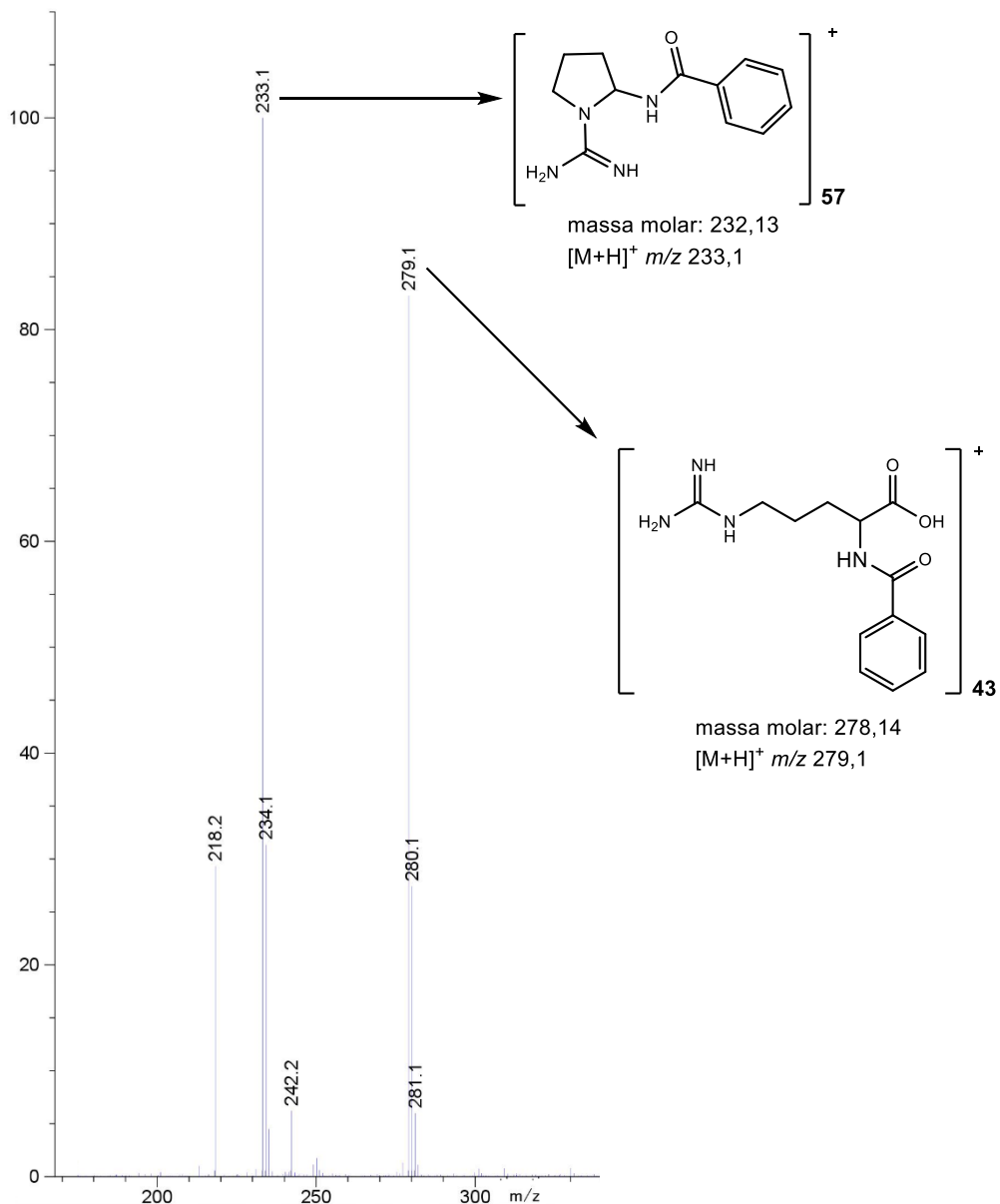


Figura 49 - Espectro de LC-MS dos compostos obtidos através da descarboxilação oxidativa do composto *N* α -benzoyl-L-arginina (**43**)

A reação de descarboxilação oxidativa radicalar do composto (4-metoxibenzoil)arginina (**53**) teve a duração de 24 h e originou uma mistura entre o material de partida **53** e o composto pretendido *N*-(1-carbamimidopirrolidin-2-il)-4-metoxi benzamida (**58**) numa proporção de 1:0,2.

O espectro de ^1H -RMN confirma a obtenção do composto **58**, através do multiplete com um desvio químico de δ 5,96 ppm e integração para um próton, respeitante ao próton do átomo de carbono 2, contudo também é possível observar a δ 4,66 ppm um multiplete respeitante ao próton do carbono 2, do material de partida ((4-metoxibenzoil)arginina, **53**). Os restantes sinais encontram-se conforme o espectável (figura 50).

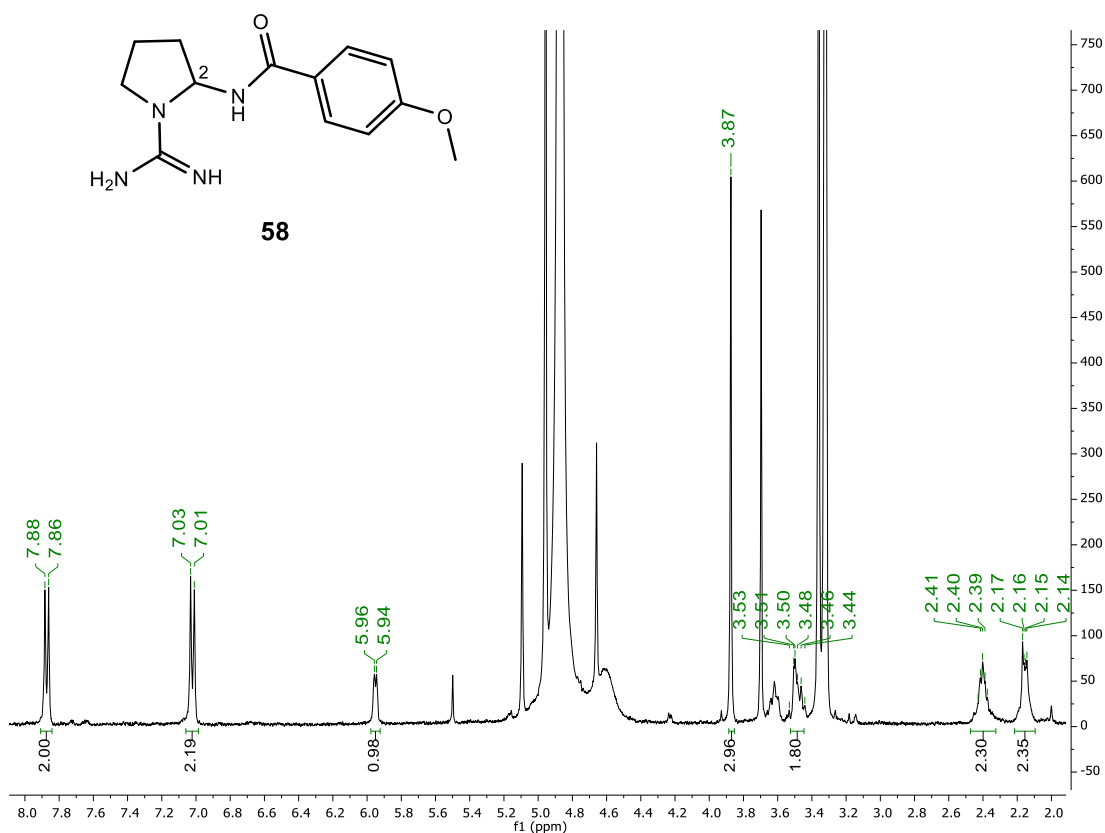


Figura 50 – Espectro de ^1H -RMN do composto *N*-(1-carbamimidopirrolidin-2-il)-4-metoxi benzamida (**58**).

O espectro de LC-MS confirma a obtenção do produto através do pico a m/z 263,2 respeitante ao composto **58** protonado, assim como também confirma a presença do material de partida pela presença do pico a m/z 309,2 correspondente ao composto **53** protonado (figura 51).

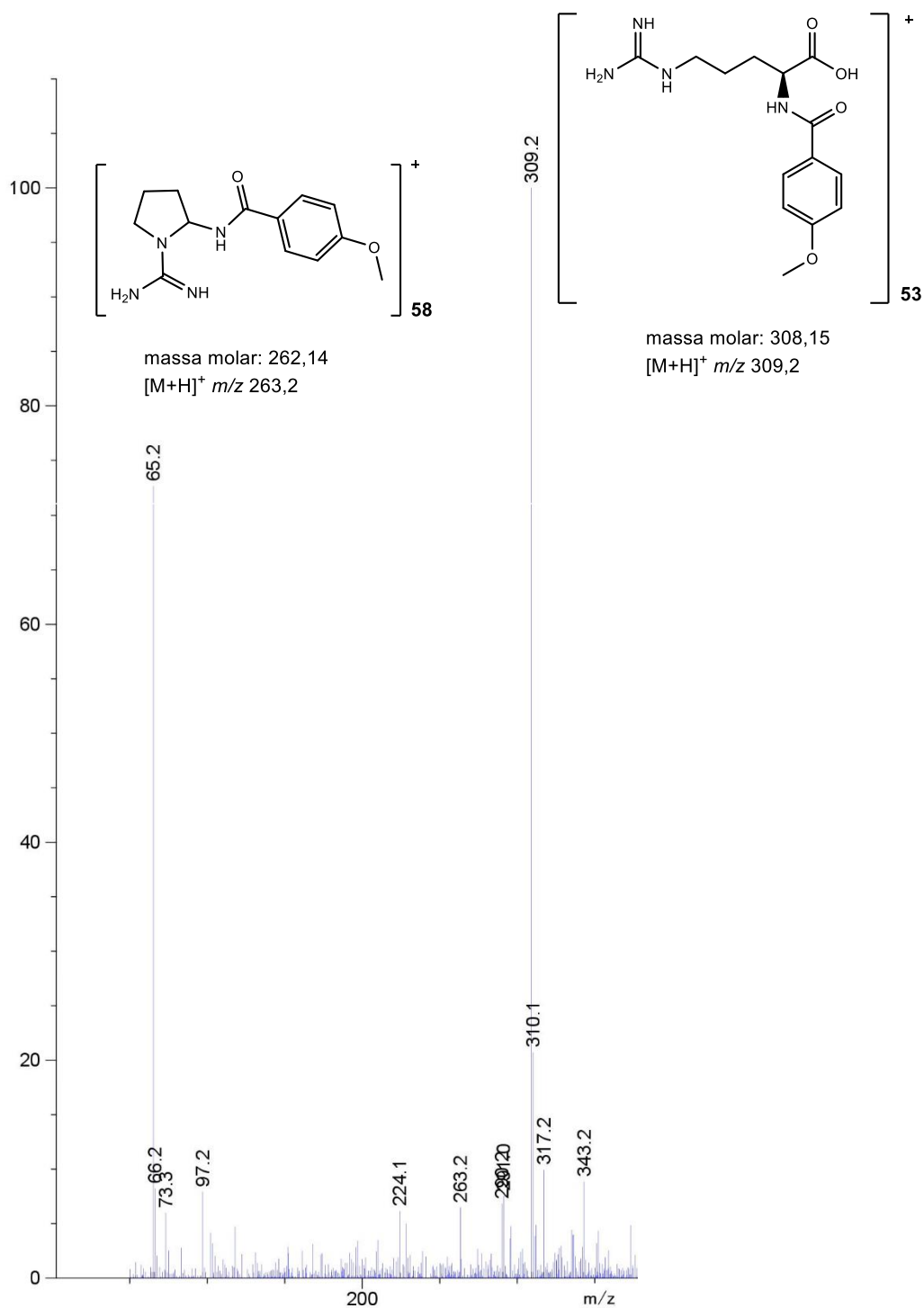


Figura 51 - Espectro de LC-MS do composto **58**.

Como referido no capítulo II.3.1.2 a reação entre a L-arginina e o cloreto de (4-metoxifenil)acrilóilo (**42**) deu origem a uma mistura isomérica. Assim sendo a reação de descarboxilação oxidativa também originou uma mistura entre o isómero *trans* ((*E*)-*N*-(1-carbamimidolpirrolidin-2-il)-3-(4-metoxifenil) acrilamida (**59**)) e o isómero *cis* ((*Z*)-*N*-(1-carbamimidolpirrolidin-2-il)-3-(4-metoxifenil) acrilamida (**60**)).

No espectro de ^1H -RMN é possível observar a δ 4,43 ppm um sinal respeitante ao próton do átomo de carbono 2 do material de partida (mistura entre (*E*)-(3-(4-metoxifenil)acrilóil)-L-arginina (**44**) e (*Z*)-(3-(4-metoxifenil)acrilóil)-L-arginina (**45**)). Os restantes sinais encontram-se de acordo com o espectável, contudo não se verifica a presença do sinal com desvio químico entre 5 e 6 ppm respeitante ao próton do átomo de carbono 2 do composto **59** (figura 52).

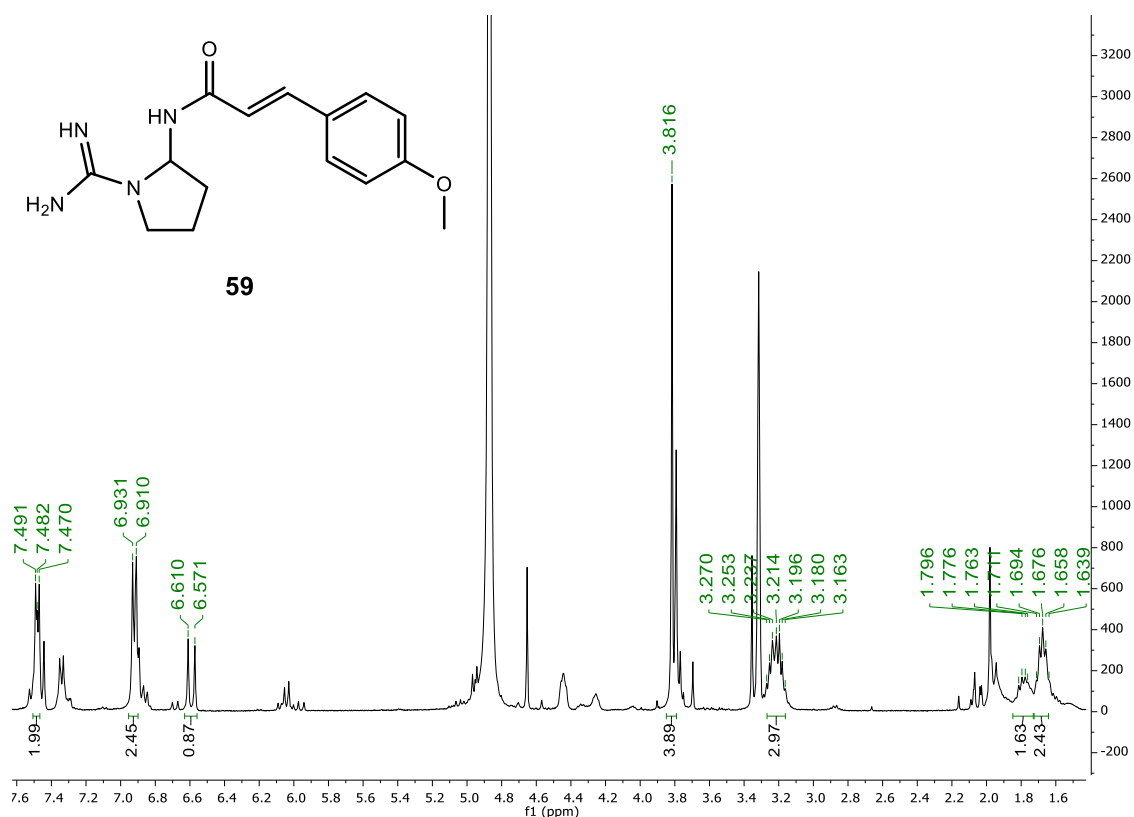


Figura 52 - Espectro de ^1H -RMN do composto **59**, realizado em CD_3OD .

Apesar do espectro de ^1H -RMN não permitir concluir com certeza a presença do composto **59**, acredita-se que o multiplete de δ 5,94 a 6,05 ppm seja correspondente ao próton do átomo de carbono 2, indicando assim a ciclização do material de partida. É ainda possível verificar a presença de isómeros, através do duplete a 6,61 ppm, com integração total para um próton e constante de acoplamento de 15,72 Hz respeitante a um dos prótons da dupla presente no isómero *trans* (composto **59**) e o duplete a δ 6,70 ppm com constante de acoplamento de 12,45 Hz correspondente a um dos prótons da dupla vicinal do isómero *cis* (composto **60**) (figura 53).

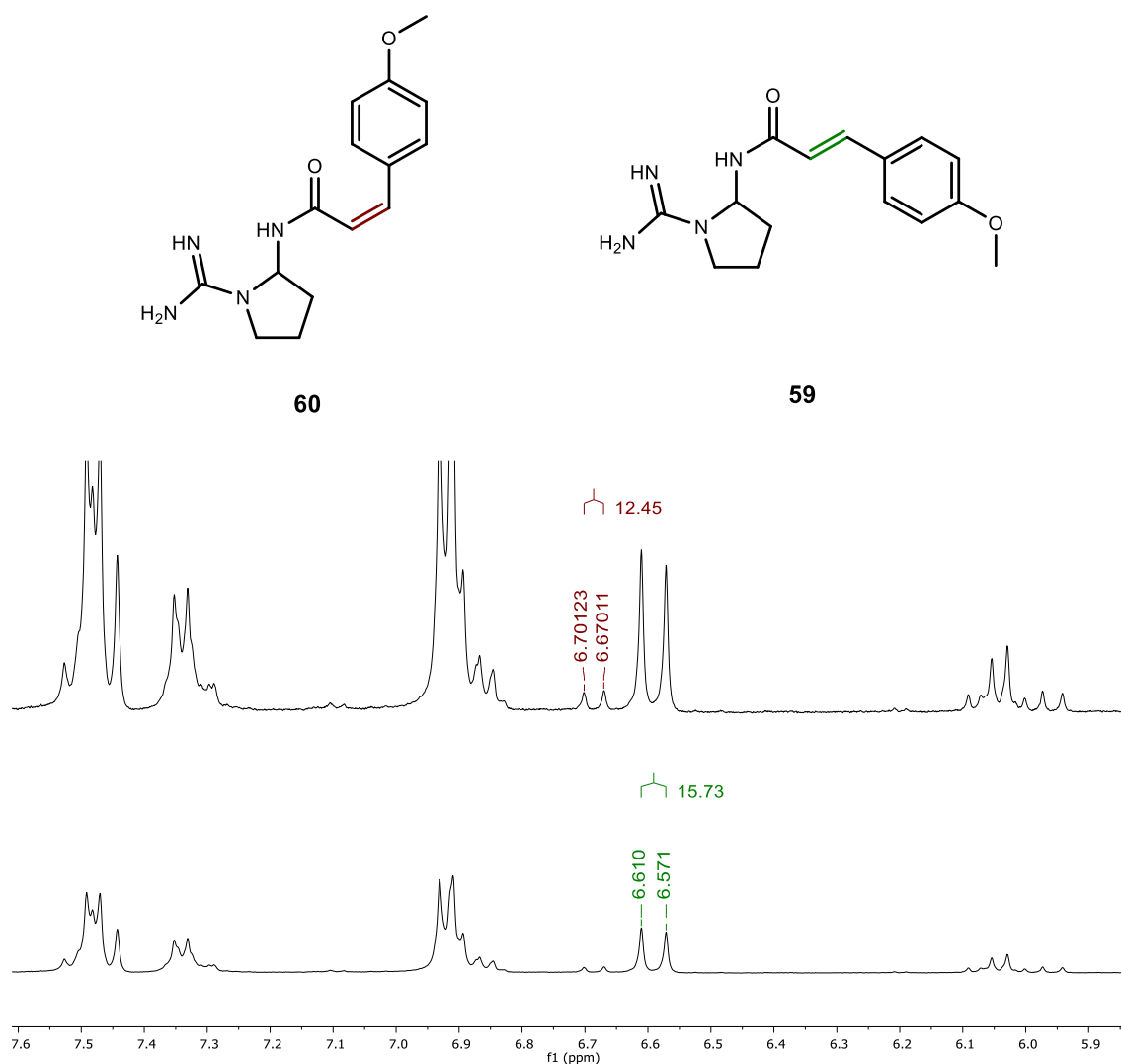


Figura 53 -Ampliação, na zona aromática, do espectro de ^1H -RMN dos compostos **59** e **60**, com respectivas identificação de sinais de próton, integração e representação da estruturas químicas.

A confirmação da descarboxilação oxidativa e do fecho do anel pirrolidina provém do espectro de LC-MS através dos picos a m/z 330 respeitante ao aduto do composto com ácido fórmico $[\text{M}+\text{AF}-\text{H}]^-$, m/z 367 respeitante a um aduto do composto com o bromo $[\text{M}+\text{Br}]^-$ em modo negativo. Também através deste espectro é possível verificar a presença do material de partida (compostos **44** e **45**) através do pico a m/z 335 respeitante ao composto protonado $[\text{M}+\text{H}]^+$ (anexos 17 e 18).

III. Conclusões e Perspetivas futuras

III. Conclusões e Perspetivas futuras

O presente trabalho teve como finalidade geral o desenvolvimento de estratégias sintéticas para a obtenção do núcleo de aminoguanidina presente no alcalóide cernumidina. Foram exploradas duas metodologias para a síntese de análogos do alcalóide baseadas na estrutura e propriedades peculiares da cernumidina.

A metodologia adotada para a L-prolina contempla cinco a seis passos de síntese, sendo estes a *N*-derivatização da L-prolina, formação da acil azida, formação do isocianato via rearranjo de Curtius, formação de uma nova ligação carbono-carbono através da armadilha do isocianato pelo reagente de Grignard, desproteção da amina e reação de guanilação.

As reações de proteção da L-prolina com a formação de carbamatos tais como o Boc, Cbz, Troc e Fmoc decorreram conforme o descrito na literatura com rendimentos aceitáveis entre 54 e 86%. A formação de acil azidas também foi considerada bem sucedida, com rendimentos entre 42 e 79%. Confirmou-se a instabilidade descrita na literatura para estas espécies, pois logo após a sua formação, sem necessidade de aquecimento, as acil azidas obtidas começaram a decompor-se e a originar o respetivo isocianato. Uma vez que o passo seguinte era a formação do isocianato, a decomposição não foi prejudicial para o desenvolvimento do trabalho. Em ambas as reações a L-prolina protegida com Troc apresentou sínteses incompletas com formação de compostos laterais e consequentemente rendimentos mais reduzidos. Na formação da carbamoil azida com a Fmoc-L-prolina foi obtida com um rendimento excelente de 95% e ao contrário do que se encontrou descrito na literatura, a espécie obtida demonstrou-se bastante estável. A obtenção da carbamoil azida 9-fluorenilmetil (S)-2-((azidocarbonil)amino) pirrolidina-1-carboxilato (**26**) permitiu explorar uma nova via sintética para que mais tarde este pudesse reagir com um nucleófilo de interesse.

As reações de rearranjo de Curtius, que origina isocianatos e o sua armadilha por reagente de Grignard foram realizadas *in situ*, tendo por isso sido difícil de quantificar o rearranjo da acil azida a isocianato, no entanto este rearranjo foi acompanhado por espectroscopia de IV, tendo-se, em todos os casos, observado o desaparecimento da banda correspondente à acil azida e o aparecimento da banda correspondente do isocianato. A reação com o brometo de fenilmagnésio originou rendimentos baixos das amidas, entre 11 a 50%, sendo o rendimento mais elevado respeitante ao composto 9-fluorenilmetil (S)-2-benzamidopirrolidina-1-carboxilato (**30**). A remoção dos grupos protetores consistiram no maior desafio desta abordagem, sendo que, em nenhuma das tentativas foi possível confirmar com exatidão a formação do composto (S)-*N*-2-pirrolidinil-benzamida (**36**).

A abordagem sintética envolvendo a formação do composto *N*-terc-butil ((2-benzamido-1-pirrolidinil)((terc-butoxycarbonil)imino)metil)carbamato (**32**) por inserção do grupo carbodiimida tem a vantagem de diminuir o número de passos sintéticos para quatro, contudo e devido às características bastante peculiares do grupo guanidina, esta via demonstrou rendimentos baixos desde a primeira reação. Apesar dos rendimentos reduzidos, a via foi levada a cabo até ao final, contudo, após a formação da respetiva acil azida o rearranjo de Curtius, à temperatura de 65 °C, não ocorreu e a reação com o brometo de fenilmagnésio originou o composto terc-butil (*E*)-((2-benzoilpirrolidin-1-il)((terc-butoxicarbonil)amino)metileno)carbamato (**31**) em vez do composto esperado *N*-terc-butil ((2-benzamido-1-pirrolidinil)((terc-butoxycarbonil)imino)metil)carbamato (**32**). Outras metodologias deverão ser adotadas para o rearranjo de Curtius neste composto e formação do respetivo isocianato.

Abandonado o estudo baseado na L-prolina, direcionou-se o foco para uma metodologia baseada na L-arginina, aminácido que já contém a guanidina livre/desprotegida na sua estrutura e pode ser facilmente $N\alpha$ -derivatizada através de cloretos de acilo ou ácidos carboxílicos.

Esta aproximação compreende menos passos sintéticos e tem após formação da $N\alpha$ -amida da L-arginina a descarboxilação oxidativa e ciclização intramolecular como passo chave. Apesar da dificuldade observada no isolamento do produto final da mistura reacional, quer a análise por RMN quer por ESI-MS apontam para a formação do produto esperado, apesar de em pequena quantidade. Dependendo do substrato usado pode ainda ser necessário proceder à remoção de grupos protetores de álcoois.

Este método possibilitou a obtenção de três análogos da cernumidina: *N*-(1-carbamimidoilpirrolidina-2-il)benzamida (**57**), *N*-(1-carbamimidoilpirrolidin-2-il)-4-metoxi benzamida (**58**) e (*E*)-*N*-(1-carbamimidoilpirrolidin-2-il)-3-(4-metoxifenil) acrilamida (**59**), contudo sempre numa mistura com o respetivo material de partida.

A descarboxilação oxidativa radicalar e posterior purificação do crude constituiu um desafio dada a semelhança entre o substrato de partida e o composto final o que torna complicado acompanhar a evolução da reação por c.c.f. e a subsequente purificação.

Futuramente é necessário otimizar as condições reacionais da descarboxilação oxidativa de modo a que estas se tornem mais completas e as purificações mais simples. Um segundo inconveniente a ter em conta em estudos futuros é a perda da quiralidade aquando da descarboxilação oxidativa. Pode-se optar pela resolução do racemato ou tentar uma aproximação mais biomimética envolvendo enzimas no processo de descarboxilação.

IV. Parte Experimental

IV.1. Preâmbulo

Os solventes e reagentes utilizados durante a parte laboratorial desta dissertação foram adquiridos comercialmente à *Sigma-Aldrich*, *Alfa Aesar*, assim como, à *Scharlau* e foram utilizados sem purificação adicional. Todos os solventes foram mencionados e, quando necessário, secos e destilados de acordo com os métodos descritos na literatura.³⁸ Os peneiros moleculares foram ativados num forno de mufla a 300 °C durante 3 horas.

As reações foram acompanhadas através de cromatografia de camada fina (c.c.f.) efetuadas em placas de sílica *Merck Kieselgel* GF 254 com 0,2 mm de espessura, em suporte de alumínio, em cromatografia de fase normal ou em placas de sílica *Merck Kieselgel* 60 RP-18 F254 com 0,2 mm de espessura, em suporte de alumínio, na cromatografia de fase reversa; a sua revelação foi feita recorrendo à luz ultravioleta (UV) a 254 nm e quando necessário a reveladores adequados a cada situação.

A medição do pH efetuou-se com papel indicador universal (*Merck*).

Os compostos foram purificados através de cromatografia em camada preparativa, efetuadas em placas de sílica *Merck Kieselgel* GF 254 com espessura de 0,2 mm ou 0,5 mm, em suportes de alumínio e vidro, respetivamente; cromatografia em coluna, realizada utilizando como fase estacionária sílica *Kieselgel* 60 (*Merck*), de granulometria 70-230 “mesh” na cromatografia de fase normal ou sílica *LiChroprep* RP-18 (*Merck*), de granulometria 40-63 µm na cromatografia de fase reversa.

A caracterização dos compostos obtidos foi realizada através da medição do ponto de fusão, espectroscopia de Infravermelho (IV), espectroscopia de Ultravioleta (UV), espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e espectrometria de massa (ESI-MS).

Os pontos de fusão, não corrigidos, foram medidos no equipamento *Reichert Thermovar*.

A espectroscopia de Infravermelho (IV) foi realizada no espectrofotómetro *Perkin Elmer Spectrum Two*. A transmitância da amostra foi adquirida entre 4000 e 400 cm⁻¹ e as amostras sólidas tiveram como suporte pastilhas de brometo de potássio (KBr) e as amostras líquidas ou oleosas discos de cloreto de sódio (NaCl). Para a descrição dos espectros foram apenas indicadas as frequências de maior relevância, maior intensidade ou as mais características. Para cada caso os dados foram indicados pela seguinte ordem: suporte da amostra; número de onda máxima de absorção (ν_{max} em cm⁻¹); atribuição a um grupo funcional presente no composto sempre que possível.

A espectroscopia de Ultravioleta (UV) foi realizada num espectrofotómetro *Thermo Corporation, Helius γ*, em suporte de célula de quartzo de 1 cm. A aquisição do espectro de absorção foram feitas numa gama de 200 a 350 nm.

A espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) foi realizada num espectrofotómetro *Brucker ARX400*, sendo as constantes de acoplamento, J, dadas em Hertz (Hz). Os espectros de protão (^1H -RMN) foram traçados a 400 MHz e os espectros de carbono (^{13}C -RMN) a 101 MHz. A descrição dos espectros obedece ao seguinte formato: solvente deutrado; desvio químico de cada sinal (δ , em ppm); multiplicidade do sinal; constante de acoplamento (J, em Hz); intensidade relativa de cada sinal (nH, n.º de protões); atribuição na molécula, sempre que possível. A referência utilizada são os sinais do solvente.

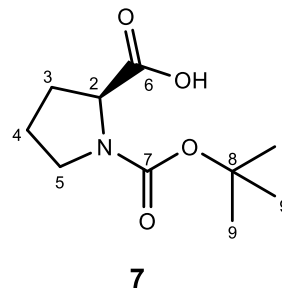
A espectrometria de Massa (ESI-MS) foi efetuada num espectrómetro de massa *LTQ Orbitrap XL* (*Thermo Fischer Scientific, Bremen Germany*) controlado por *LTQ Tune Plus 2.5.5* e *Xcalibur 2.1.0*. A descrição destes espectros obedece ao seguinte formato: massa (m/z); atribuição da molécula. A designação $[\text{M}+\text{H}]^+$ corresponde sempre ao ião molecular protonado de interesse.

A cromatografia gasosa acoplada a massa (GC-MS) foi realizada num cromatógrafo Agilent 6890N, acoplado a um detetor Thermo DSQ, de impacto eletrónico (EI) (REQUIMTE/fct). A descrição destes espectros obedece ao seguinte formato: massa (m/z); atribuição da molécula. A designação $[\text{M}+\text{H}]^+$ corresponde sempre ao ião molecular protonado de interesse.

IV.2. Reações de *N*-derivatização da L-prolina

IV.2.1. Síntese da *N*-*tert*-butiloxycarbonil-S-prolina (**7**)

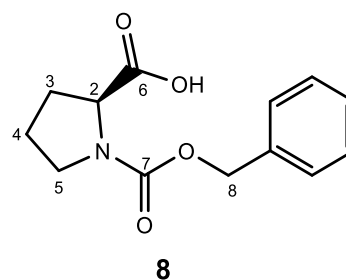
Num balão de fundo redondo, equipado com agitador magnético, dissolveu-se 400,7 mg (1 eq, 3,48 mmol) de L-prolina em 20 mL de 1,4-dioxano e 10 mL de água destilada. De seguida adicionou-se 1,74 mL de uma solução aquosa de Na₂CO₃ 2M (1 eq, 3,48 mmol), arrefeceu-se a mistura reacional a 0 °C e adicionou-se 0,87 mL de di-*tert*-butil-dicarbonato (1,1 eq, 3,83 mmol). A reação decorreu à temperatura ambiente durante 24h. Monitorizou-se a reação por c.c.f., usando como eluente diclorometano e metanol (7:3) e revelação com ninidrina e reagente de Dragendorff. Após o consumo da L-prolina o solvente orgânico foi removido, a pressão reduzida, e o resíduo aquoso foi lavado com acetato de etilo. Desprezou-se a fase orgânica e a fase aquosa foi acidificada com HCl 1M até pH 2. Extraíu-se com acetato de etilo e a fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro, filtrada e evaporada à secura. Obteve-se 531,5 mg de um sólido branco (**7**), com rendimento de 70,95%.



Pf: 120-124 °C (lit. 135-137 °C); **IV (KBr) $\nu_{\text{máx}}$ (cm⁻¹):** 3200-2536 (OH), 2989-2896 (CH alifáticos), 1739 (C(=O)OH), 1638 (NC(=O)O); **¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm):** (presença de rotâmeros) 4,34 e 4,23 (2sl, 1H, H-2), 3,60-3,30 (m, 2H, CH₂-5), 2,26 (sl, 1H, H-3a), 2,07 (sl, 1H, H-3b), 2,00-1,82 (m, 2H, CH₂-4), 1,47 e 1,41 (2s, 9H, CH₃-9). Os resultados obtidos estão de acordo com o descrito na literatura.³⁹

IV.2.2. Síntese da *N*-benziloxycarbonil-S-prolina (**8**)

Um balão de fundo redondo equipado com agitação magnética e contendo 1,11 mL de solução aquosa de NaOH 2M (1,25 eq, 2,21 mmol) foi arrefecido a 0 °C e a essa temperatura adicionou-se 203,7 mg de L-prolina (1 eq, 1,77 mmol). Lentamente, adicionou-se 0,53 mL de cloroformiato de benzilo (2 eq, 3,54 mmol) e 0,6 mL de uma solução aquosa de NaOH 4M. As adições foram realizadas em simultâneo, de forma gradual e tiveram a duração de 1 h. A reação foi acompanhada por c.c.f., usando como eluente diclorometano e revelação com ninidrina e reagente de Dragendorff. Após o consumo da L-prolina, lavou-se a mistura reacional com éter etílico. A fase aquosa foi acidificada com HCl 6M, em banho de gelo, até pH 2 e extraída com acetato de etilo. A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro, filtrada e evaporada à secura tendo-se obtido 380,6 mg de um óleo amarelo (**8**), com rendimento de 86,30%.



obtidos estão de acordo com o descrito na literatura.⁴⁰

IV.2.3. Síntese da ((2',2',2'-tricloroetoxi)carbonil)-S-prolina (**9**)

9

9

com o descrito na literatura.⁴¹

IV.2.4. Síntese da *N,N'*-di(*terc*-butoxicarbonil)carbamimidoil-S-prolina (**11**)

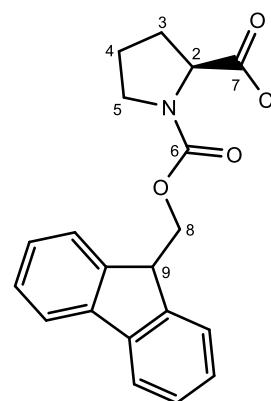
numa mistura de 1% metanol em diclorometano, revelação com ninidrina e reagente de Dragendorff. Após esse tempo, removeu-se o solvente orgânico, a pressão reduzida, e lavou-se a fase aquosa com acetato de etilo. Desprezou-se a fase orgânica, acidificou-se a fase aquosa com HCl 1M até pH 2 e extraiu-se com acetato de etilo. A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro, filtrada e evaporada à secura. Obteve-se 67,8 mg de um óleo branco (**11**), com rendimento de 10,83%.

IV (NaCl) $\nu_{\text{máx}}$ (cm^{-1}): 3500-2850 (OH), 3282 (NH), 2982-2934 (CH alifáticos), 1717 (C(=O)OH, NC(=O)O). **^1H RMN (400 MHz, $\text{CO}(\text{CD}_3)_2$) δ (ppm):** 4,61-5,58 (dd, $J=7,6$ e $4,8$ Hz, 1H, H-2), 3,70-3,64 (m, 2H, CH_2 -5), 2,32 (s, 1H, NH), 2,25-2,15 (m, 2H, CH_2 -3), 2,01-1,93 (m, 2H, CH_2 -4), 1,44 (s, 18H, CH_3 -10, CH_3 -10').

IV.3. Síntese do 9-fluorenilmetil (S)-2-(clorocarbonil)pirrolidina-1-carboxilato (**21**)

Método A

Num batão de duas tubuladuras, equipado com agitador magnético e sob atmosfera inerte, dissolveu-se 251,1 mg de Fmoc-L-prolina (1,0 eq, 7,44 mmol), em 3,5 mL de diclorometano seco e adicionou-se uma gota de DMF seco. De seguida adicionou-se, gota-a-gota, 0,126 mL de cloreto de oxalilo (2 eq, 1,49 mmol). A reação teve duração de 3h e foi acompanhada por c.c.f. em diclorometano, revelação com reagente de Dragendorff. Obteve-se 245,5 mg de um óleo amarelo (**21**), com rendimento de 92,70%.



21

IV (NaCl) $\nu_{\text{máx}}$ (cm^{-1}): 3063 e 3019 (CH aromáticos), 2983 a 2887 (CH alifáticos), 1786 (C(=O)Cl), 1702 (NC(=O)O); **^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm):** 7,77-7,70 (m, 2H, H-Ar), 7,61-7,53 (m, 2H, H-Ar), 7,42-7,28 (m, 4H, H-Ar), 4,51-4,43 (m, 1H, H-8a), 4,42-4,34 (m, 1H, H-8b), 4,28-4,25 (m, 1H, H-9), 4,19-4,08 (m, 0,4H, H-2) 3,60-3,57 (m, 1H, H-5a), 3,53-3,44 (m, 1H, H-5b), 2,23-2,20 (m, 2H, CH_2 -3), 2,01-1,91 (m, 2H, CH_2 -4).

Método B

Num balão de fundo redondo, equipado com agitador magnético e sob atmosfera inerte, dissolveu-se 75,0 mg de Fmoc-L-prolina (1 eq, 0,22 mmol) em 94,5 μL de cloreto de tionilo (6 eq, 1,30 mmol). Deixou-se reagir por 2h. A reação foi acompanhada por c.c.f. em diclorometano, revelação com reagente de Dragendorff. Ao fim desse tempo evaporou-se os compostos voláteis,

tendo-se obtido 69,9 mg de composto sob a forma de um óleo amarelo pálido (**21**), com rendimento de 90,54%.

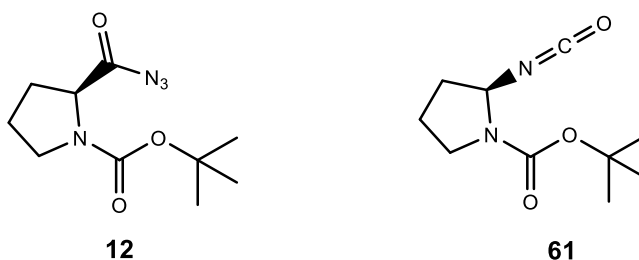
IV (NaCl) $\nu_{\text{máx}}$ (cm^{-1}): 3069 e 3042 (CH aromáticos), 2980 a 2887 (CH alifáticos), 1792 (C(=O)Cl), 1708 (NC(=O)O).

IV.4. Síntese de acilazidas

IV.4.1. Procedimento geral

Num balão de fundo redondo, equipado com agitador magnético e sob atmosfera inerte dissolveu-se a respectiva L-prolina *N*-derivatizada (1 eq) em THF seco. À solução adicionou-se, lentamente, *N*-metil-morfolina (1,1 eq), de seguida arrefeceu-se a mistura reacional até -10 °C e a essa temperatura adicionou-se cloroformiato de isobutilo (1,1 eq). Após 20min., deixou-se a mistura atingir os 0 °C e adicionou-se fosfato de potássio monobásico (3 eq) e azida de sódio (1,5 eq), dissolvida em 1 mL de água destilada. De seguida, a reação decorreu à temperatura ambiente, durante 2h e foi monitorizada por c.c.f. tendo como eluente uma mistura de 2% metanol em diclorometano, e revelação com reagente de Dragendorff. Após se verificar o consumo da L-prolina *N*-derivatizada, evaporou-se o solvente orgânico, adicionou-se acetato de etilo e lavou-se com água destilada, solução tampão $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ pH 7 e *brine*. Secou-se a fase orgânica com sulfato de sódio anidro, filtrou-se e evaporou-se à secura.

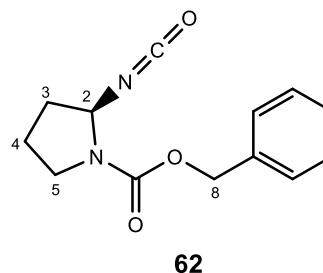
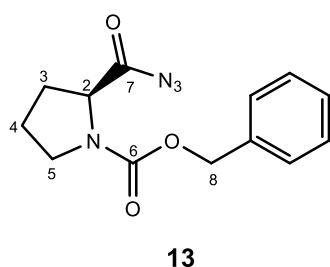
IV.4.1.1. Síntese da *terc*-butil-carboxilato 2-*S*-azidocarbonil pirrolidina (**12**)



Seguindo o procedimento geral previamente descrito para a síntese de acilazidas, fez-se reagir 706 mg de *N-terc*-butiloxycarbonil-*S*-prolina (**7**) (1 eq, 3,28 mmol) com 319,2 mg de azida de sódio (1,5 eq, 4,92 mmol). Obteve-se 625,2 mg de um óleo castanho respeitante a uma mistura entre o composto *Terc*-butil-carboxilato 2-*S*-azidocarbonil pirrolidina (**12**) e o *terc*-butil-carboxilato 2-*S*-isocianato pirrolidina (**61**).

IV (NaCl) $\nu_{\text{máx}}$ (cm^{-1}): 2977-2883 (CH alifáticos), 2246 (N=C=O), 2138 (N_3), 1699 (NC(=O)O, C(=O) N_3).

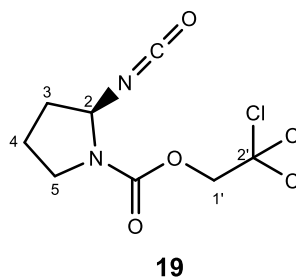
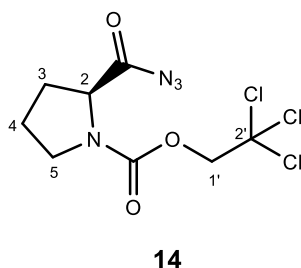
IV.4.1.2. Síntese do (S)-2-(azidocarbonil)pirrolidina-1-carboxilato de benzilo (**13**)



Segundo o procedimento geral previamente descrito para a síntese de acilazidas, fez-se reagir 112,9 mg de *N*-benziloxycarbonil-*S*-prolina (**8**) (1 eq, 0,45 mmol) com 44,7 mg de azida de sódio (1,5 eq, 0,67 mmol). Obteve-se 92 mg de um óleo incolor respeitante a uma mistura entre o composto (S)-2-(azidocarbonil)pirrolidina-1-carboxilato de benzilo (**13**) e o (S)-2-(isocianato)pirrolidina-1-carboxilato de benzilo (**62**).

IV (NaCl) $\nu_{\text{máx}}$ (cm^{-1}): 3066-3034 (CH aromáticos), 2960-2883 (CH alifáticos), 2246 ($\text{N}=\text{C}=\text{O}$), 2140 (N_3), 1704 ($\text{NC}(=\text{O})\text{O}$, $\text{C}(=\text{O})\text{N}_3$); **^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm):** 7,41-7,33 (m, 5H, H-Ar), 5,59 e 5,51 (2sl, 0,7H, H-2 **composto 62**), 5,30-5,05 (m, 2H, CH_2 -8), 4,37-4,28 (m, 0,14H, H-2 **composto 13**), 3,65-3,57 (m, 1H, H-5a), 3,39-3,29 (m, 1H, H-5b), 2,01-1,90 (m, 4H, CH_2 -3, CH_2 -4).

IV.4.1.3. Síntese do 2',2',2'-tricloroetil (S)-2-(azidocarbonil)pirrolidina-1-carboxilato (**14**)

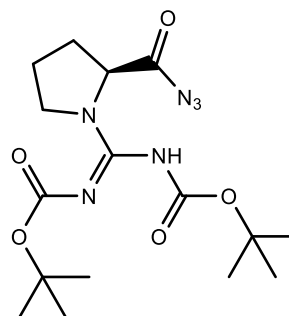


Segundo o procedimento geral previamente descrito para a síntese de acilazidas, fez-se reagir 262,8 mg de ((2',2',2'-tricloroetoxi)carbonil)-*S*-prolina (**9**) (1 eq, 0,90 mmol) com 87,7 mg de azida de sódio (1,5 eq, 1,36 mmol). Obteve-se 122,1 mg de um óleo amarelo respeitante à mistura entre o composto 2',2',2'-tricloroetil (S)-2-(azidocarbonil)pirrolidina-1-carboxilato (**14**) e o 2',2',2'-tricloroetil (S)-2-(isocianato)pirrolidina-1-carboxilato (**19**).

IV (NaCl) $\nu_{\text{máx}}$ (cm^{-1}): 2958-2886 (CH alifáticos), 2250 (N=C=O), 2142 (N_3), 1724 (NC(=O)O e C(=O) N_3); **^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm):** 5,63 (dd, $J=11,6$ Hz, 2,56 Hz, 0,4H, H-2 **composto 19**), 4,92-4,61 (m, 2H, H-1'), 4,41-4,36 (m, 1H, H-2 **composto 14**), 3,73-3,63 (m, 1H, H-5a), 3,60-3,55 (m, 1H, H-5b), 2,37-2,24 (m, 1H, H-3a), 2,14-2,08 (m, 1H, H-3b), 2,03-1,93 (m, 2H, CH_2 -4).

IV.4.1.4. Síntese da *N,N*-di(*tert*-butoxicarbonil)carbamimidoil)-L-prolinoil azida (**15**)

Segundo o procedimento geral previamente descrito para a síntese de acilazidas, fez-se reagir 56,2 mg de *N,N*-di(*tert*-butoxicarbonil)carbamimidoil-L-prolina (**11**) (1 eq, 0,15 mmol) com 15,6 mg de azida de sódio (1,5 eq, 0,23 mmol). Obteve-se 43,6 mg de um óleo amarelo correspondentes ao composto *N,N*-di(*tert*-butoxicarbonil)carbamimidoil)-L-prolinoil azida (**15**), com rendimento de 72,51%.

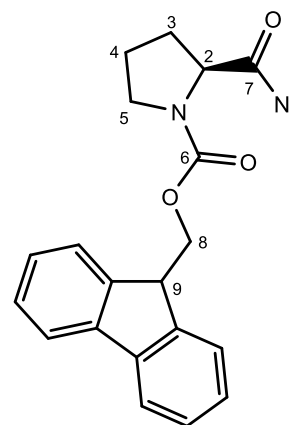


15

IV (NaCl) $\nu_{\text{máx}}$ (cm^{-1}): 3286 (NH), 2981 e 2934 (CH_2 e CH_3 alifáticos), 2140 (N_3), 1765 (C(=O) N_3 , NC(=O)O).

IV.4.2. Síntese do 9-Fluorenilmetil (*S*)-2-(azidocarbonil)pirrolidina-1-carboxilato (**22**)

Num balão de fundo redondo equipado com agitador magnético e sob atmosfera inerte, dissolveu-se 110 mg de 9-fluorenilmetil (*S*)-2-(clorocarbonil)pirrolidina-1-carboxilato (**21**) (1 eq, 0,30 mmol) em 0,9 mL de acetona seca, arrefeceu-se a solução até 0 °C e adicionou-se, gota-a-gota, 38 mg de azida de sódio (1,48 eq, 0,45 mmol) em 0,2 mL de água destilada. A reação decorreu à temperatura de 0 °C, teve a duração de 1h30min. e foi monitorizada por c.c.f. em diclorometano, revelação com reagente de Dragendorff. Após esse tempo adicionou-se água destilada e efetuaram-se extrações com acetato de etilo. A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro, filtrada e evaporada à secura. Obteve-se 85,5 mg de um óleo castanho (**22**), num rendimento de 76,32%.



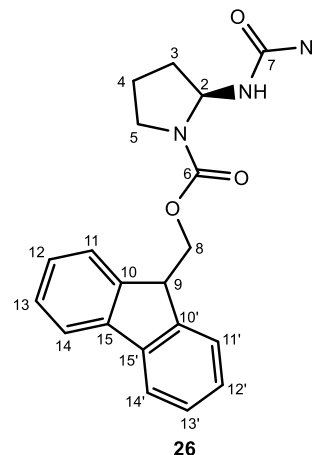
22

IV (NaCl) $\nu_{\text{máx}}$ (cm^{-1}): 3066 (CH aromáticos), 2918-2850 (CH alifáticos), 2142 (N_3), 1704 (C(=O)OH e NC(=O) N_3). **^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm):** 7,78 (d, $J=7,56$ Hz, 2H, H-Ar), 7,59

(t, $J=7,63$ Hz, 2H, H-Ar), 7,41 (t, $J=7,39$ Hz, 2H, H-Ar), 7,32 (t, $J=7,64$ Hz, 2H, H-Ar), 4,52-4,44 (m, 3H, CH_2 -8 e H-9), 4,26 (sl, 1H, H-2), 3,66-3,42 (m, 2H, CH_2 -5), 2,17 (s, 1H, H-3a), 2,05-1,91 (m, 3H, H-3b e CH_2 -4).

IV.5. Síntese do 9-Fluorenilmetil (S)-2-((azidocarbonil)amino) pirrolidina-1-carboxilato (**26**)

Num balão de duas tubuladuras, equipado com agitador magnético e sob atmosfera inerte, dissolveu-se 159,1 mg (1 eq, 0,47 mmol) de 9-fluorenilmetil (S)-2-(clorocarbonil)pirrolidina-1-carboxilato (**21**), em 1 mL de acetona seca. Arrefeceu-se a solução até 0 °C e adicionou-se 184,0 mg de fosfato de potássio monobásico (3 eq, 1,34 mmol) e de seguida, gota-a-gota, adicionou-se 60,0 mg de azida de sódio (2 eq, 0,89mmol) dissolvida em 1 mL de água. A reação foi acompanhada por c.c.f. em diclorometano, revelação com reagente de Dragendorff; ao fim de 3 horas, retirou-se o arrefecimento e aqueceu-se a mistura reacional até 65 °C (externos). Deixou-se reagir a essa temperatura durante uma noite, após esse tempo efetuou-se extrações com diclorometano. A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro, filtrada e evaporada à secura, tendo-se obtido 161,9 mg de um óleo castanho, num rendimento de 95,94% (**26**).



IV (NaCl) $\nu_{\text{máx}}$ (cm^{-1}): 3286 (NH), 3064 (CH aromáticos), 2976-2891 (CH alifáticos), 2147 (N_3), 1703 (NC(=O)N_3), 1686 (NC(=O)O); **^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) σ (ppm):** 7,82-7,68 (m, 2H, H-Ar), 7,64-7,51 (m, 2H, H-Ar), 7,45-7,27 (m, 4H, H-Ar), 5,56-5,36 (m, 1H, H-2), 5,30 (sl, 0,41H, NH) 4,54-4,31 (m, 2H, CH_2 -8), 4,28-4,06 (m, 1H, H-9), 3,68-3,41 (m, 1H, H-5a), 3,39-3,20 (m, 1H, H-5b), 2,10-1,80 (m, 4H, CH_2 -3, CH_2 -4); **^{13}C RMN (101 MHz, CDCl_3) σ (ppm):** 162,87 (C-7), 154,62 (C-6), 143,95 (C-10, C-10'), 141,46 (C-15, C-15'), 127,87 (C-13, C-13'), 127,06 (C-12, C-12'), 125,07 (C-11, C-11'), 120,13 (C-14, C-14'), 67,51 (C-8), 53,89 (C-2), 47,30 (C-9), 29,36 (C-5), 23,24 (C-3), 23,15 (C-4); **LC-MS FIA:** m/z 378 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 777 $[2\text{M}+\text{Na}]^+$.

IV.6. Rearranjo de Curtius

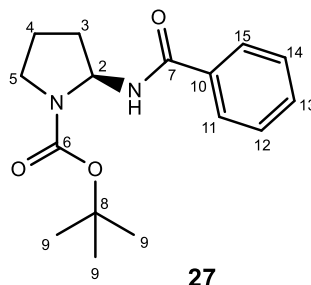
IV.6.1. Procedimento geral

Colocou-se a respetiva acilazida (1 eq) em tolueno seco, a refluxo (65 °C) durante 50 minutos. A reação foi acompanhada por IV, observando-se o desaparecimento da banda da azida e o aparecimento da banda do isocianato. Parou-se o aquecimento e arrefeceu-se a reação até

0 °C, tendo-se de seguida adicionado o brometo de fenilmagnésio (1,5 eq). A reação foi monitorizada por IV, observando-se o consumo do isocianato e por c.c.f. em *n*-hexano-acetato de etilo (8:2), revelação com reagente de Dragendorff; ao fim de 24 h parou-se a reação, adicionou-se água destilada, evaporou-se o solvente orgânico e efetuaram-se extrações com diclorometano, a fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro, filtrada e evaporada à secura. O crude obtido foi purificado numa coluna de cromatografia em sílica gel, tendo como eluente uma mistura de *n*-hexano e acetato de etilo (7:3).

IV.6.1.1. Síntese de *N*-*tert*-butil 1-carboxilato-(*S*)-2-benzamido pirrolidina (27)

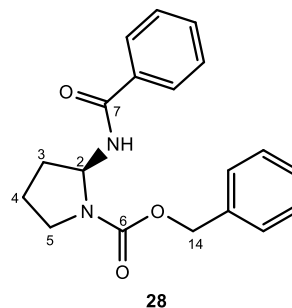
Segundo o procedimento geral previamente descrito em IV.6.1 e partindo da *tert*-butil-carboxilato 2-*S*-azidocarbonil pirrolidina (12) (2,9 mmol; 625,2 mg) procedeu-se ao rearranjo de Curtius e após a formação do isocianato correspondente fez-se reagir com 0,62 mL de brometo de fenilmagnésio (3,48 mmol). Obteve-se 115,9 mg de um sólido castanho (27) num rendimento de 15,34%.



Pf: 156-162 °C; **IV (KBr) $\nu_{\text{máx}}$ (cm^{-1}):** 3381 (NH), 2976 (CH alifáticos), 1698 (C(=O)NH e C(=O)OC); **^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm):** 7,77-7,72 (m, 1H, H-13), 7,55-7,47 (m, 2H, H-12 e H-14), 7,47-7,40 (m, 2H, H-11 e H-15), 6,61 (sl, 1H, NH), 5,90-5,64 (m, 1H, H-2), 3,60-3,43 (m, 1H, H-5a), 3,41-3,25 (m, 1H, H-5b), 2,23-2,00 (m, 2H, CH_2 -3) 2,02-1,88 (m, 2H, CH_2 -4), 1,48, 1,45 e 1,42 (3s, 9H, CH_3 -9).

IV.6.1.2. (*S*)-2-benzamidopirrolidina-1-carboxilato de benzilo (28)

Segundo o procedimento geral previamente descrito em IV.6.1 e partindo do composto (*S*)-2-(azidocarbonil)pirrolidina-1-carboxilato de benzilo (13) (1,32 mmol; 184,8 mg) procedeu-se ao rearranjo de Curtius e após a formação do isocianato correspondente, fez-se reagir com 0,35 mL de brometo de fenilmagnésio (1,99 mmol). Obteve-se 44,3 mg um óleo transparente (28), com rendimento de 18,2%.

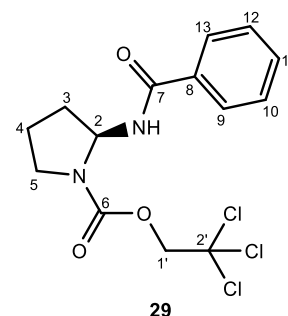


IV (NaCl) $\nu_{\text{máx}}$ (cm^{-1}): 3306 (NH), 3062 (CH aromáticos), 2978-2885 (CH alifáticos), 1707 (NC(=O)O), 1651 (NC(=O)Ph). **^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm):** 7,67-7,19 (m, 10H, H-Ar), 6,52 (sl, 1H, NH), 5,93-5,74 (m, 1H, H-2), 5,20-5,02 (m, 2H, H-14), 3,67-3,50 (m, 1H, H-5a), 3,40-

3,38 (m, 1H, H-5b), 2,21-2,12 (m, 2H, CH₂-3) 1,97-1,86 (m, 2H, CH₂-4); **LC-MS FIA:** *m/z* 347,1 [M+Na]⁺, 325,1 [M+H]⁺.

IV.6.1.3. Síntese de (S)-2-benzamidopirrolidina-1-carboxilato de 2',2',2'-tricloroetil (**29**)

Seguindo o procedimento geral previamente descrito em IV.6.1 e partindo da 2',2',2'-tricloroetil (S)-2-(azidocarbonil)pirrolidina-1-carboxilato (**14**) (0,38 mmol; 122,1 mg) procedeu-se ao rearranjo de Curtius e após a formação do isocianato correspondente, fez-se reagir com 0,83 µL de brometo de fenilmagnésio (0,46 mmol). Obteve-se 16,6 mg de um óleo incolor (**29**), com rendimento de 11,66 %.



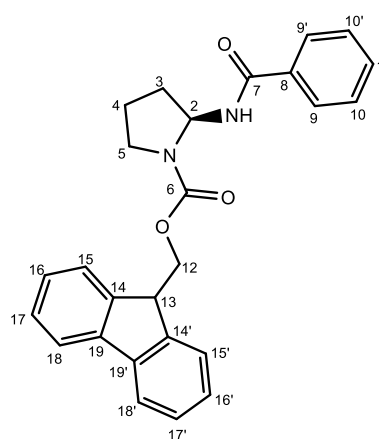
IV (NaCl) $\nu_{\text{máx}}$ (cm⁻¹): 3369 (NH), 1720 (NC(=O)Ph, NC(=O)O).

¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7,75 (d, *J*=7,24 Hz, 2H, H-9, H-13), 7,49 (t, *J*=7,4 Hz, 1H, H-11), 7,41 (t, *J*=7,68 Hz, 2H, H-10, H-12), 6,47 e 6,42 (2sl, 1H, NH), 5,96 e 5,79 (2sl, 1H, H-2) 4,97 (d, *J*=11,85 Hz, 1H, H-1'a), 4,55 (d, *J*=11,88 Hz, 1H, H-1'b), 3,69 (m, 1H, H-5a) 3,53-3,41 (m, 1H, H-5b), 2,27-2,19 (m, 2H, CH₂-3) 2,02-1,99 (m, 2H, CH₂-4).

IV.7. Síntese de 9-Fluorenilmetil (S)-2-benzamidopirrolidina-1-carboxilato (**30**)

Método A

Seguindo o procedimento geral previamente descrito em IV.6.1 e partindo do 9-fluorenilmetil (S)-2-(azidocarbonil)pirrolidina-1-carboxilato (**22**) (0,23 mmol; 85,5 mg) procedeu-se ao rearranjo de Curtius e após a formação do isocianato, fez-se reagir com 85 µL de brometo de fenilmagnésio (1,2 eq, 0,28 mmol). O crude foi purificado através de cromatografia em camada preparativa, num eluente de *n*-hexano:acetato de etilo (7:3), tendo-se obtido 10,1 mg de um óleo incolor, correspondente ao composto (**30**), com rendimento de 10,38%.



IV (NaCl) $\nu_{\text{máx}}$ (cm⁻¹): 3320 (NH), 3064-2978 (CH aromáticos), 2889 (CH alifáticos), 1699 (NC(=O)Ph), 1635 (NC(=O)O); **¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm):** 7,7-6,97 (m, 13H, H-Ar), 6,35 e 6,26 (2sl, 1H, NH), 5,86 e 5,73 (2sl, 1H, H-2),

4,41 (s, 2H, CH₂-12), 4,23 (d, *J*=16,4 Hz, 1H, H-13), 3,68-3,56 (m, 1H, H-5a), 3,51-3,34 (m, 1H, H-5b), 2,32-2,12 (m, 2H, CH₂-3), 2,07-1,93 (m, 2H, CH₂-4).

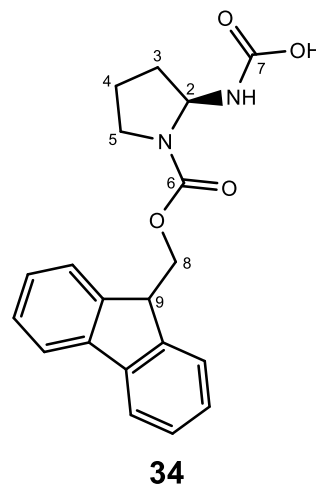
Método B

Num balão de fundo redondo, equipado com agitador magnético e sob atmosfera inerte, dissolveu-se 152,4 mg de 9-Fluorenilmetil (S)-2-((azidocarbonil)amino) pirrolidina-1-carboxilato (**26**) (1 eq, 0,40 mmol) em 2,5 ml de THF seco e arrefeceu-se, a solução até - 20 °C; a essa temperatura adicionou-se 0,50 mL de brometo de fenilmagnésio (1,2 eq, 0,48 mmol), deixou-se reagir à temperatura durante 4h. A reação foi monitorizada por c.c.f. usando como eluente diclorometano com 1% metanol, revelação com reagente de Dragendorff. Após verificar o consumo total do composto **26**, adicionou-se água destilada e evaporou-se o solvente orgânico. Realizaram-se extrações com diclorometano, a fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro, filtrada e evaporada à secura. O crude foi submetido a uma coluna de cromatografia num eluente 1% metanol em diclorometano, tendo-se obtido 49,5 mg de composto (**30**), sob a forma de um sólido branco, com rendimento de 29,72%.

Pf: 156-159 °C; Os espectros de IV e de ¹H-RMN estão de acordo com os dados obtidos do produto preparado pelo método A; **¹³C RMN (101 MHz, CDCl₃) δ (ppm):** 169,38 (C-7), 154,99 (C-6), 143,98 (C-14 e C-14'), 141,46 (C-19 e C-19'), 132,19 (C-8), 131,77 (C-11), 128,78 (C-10), 127,73 (C-17 e C-17'), 127,47 (C-9), 127,20 (C-16 e C-16'), 125,13 (C-15 e C-15'), 120,08 (C-18 e C-18'), 67,44 (C-12), 53,57 (C-2), 47,34 (C-13), 34,06 (C-5), 45,81 (C-3), 22,41 (C-4); **LC-MS FIA:** *m/z* 413 [M+H]⁺, 847 [2M+Na]⁺.

IV.8. Síntese do ácido (1-(((9-fluorenil)metoxi)carbonil)-2-pirrolidinil)carbâmico (**34**)

Num balão de fundo redondo, equipado com agitador magnético e atmosfera inerte dissolveu-se 30,7 mg de 9-fluorenilmetil-(S)-2-((azidocarbonil)amino)pirrolidina-1-carboxilato (**26**) (0,08 mmol) em 5 mL de THF seco. À solução adicionou-se 10 mL de uma solução saturada de bicarbonato de sódio. A reação decorreu em agitação durante 2h30min. e foi monitorizada por c.c.f. numa solução de 2% metanol em diclorometano, revelação com reagente de Dragendorff. Após esse tempo, o solvente orgânico foi removido a pressão reduzida, adicionou-se água e efetuaram-se extrações com diclorometano. A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro, filtrada e evaporada à secura; obteve-se um crude,



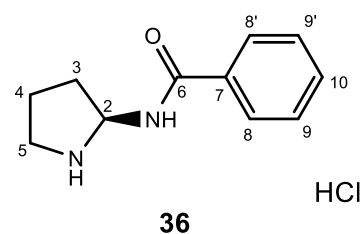
purificado através de cromatografia em camada preparativa, com eluente de 1% de metanol em diclorometano. Obteve-se 3,2 mg de um óleo castanho (**34**), com rendimento de 11,16%.

IV (NaCl) $\nu_{\text{máx}}$ (cm⁻¹): 3500-3000 (OH), 1643 (C(=O)OH, NC(=O)O). **¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm):** 7,78 (d, J = 6,53 Hz, 2H, H-Ar), 7,64-7,54 (m, 2H, H-Ar), 7,41 (t, J = 7.82 Hz, 2H, H-Ar), 7,35-7,28 (m, 2H, H-Ar), 5,46 e 5,38 (2sl, 1H, H-2), 4,57-4,36 (m, 2H, CH₂-8), 4,29-4,17 (m, 1H, H-9), 3,57-3,42 (m, 1H, H-5a), 3,40-3,23 m, 1H, H-5b), 2,14-2,01 (m, 2H, CH₂-3) 1,97-1,88 (m, 2H, CH₂-4).

IV.9. Síntese da (S)-N-2-pirrolidinil-benzamida (**36**)

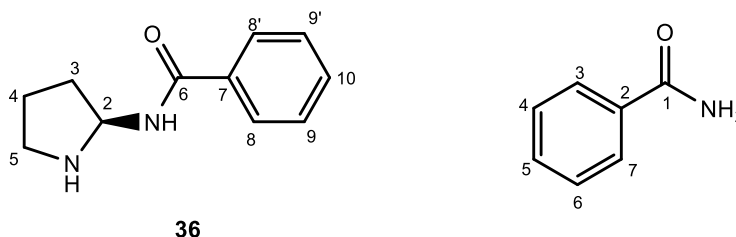
IV.9.1. Por remoção do grupo protetor Boc

Num balão de fundo redondo equipado com agitador magnético e sob atmosfera inerte, dissolveu-se 115,9 mg do composto *N*-*tert*-butil 1-carboxilato-(S)-2-benzamido pirrolidina (**27**) (1 eq, 0,187 mmol) em 5 mL de acetato de etilo seco. A solução foi arrefecida até à temperatura de 0 °C e, gota-a-gota, adicionou-se 40 μ L de cloreto de acetilo (3 eq, 0,56 mmol) e de seguida 23 μ L de metanol seco (3 eq, 5,63 mmol). Manteve-se a reação em banho de gelo durante 2 h. Após esse tempo a reação decorreu à temperatura ambiente durante 24h e foi monitorizada por c.c.f. em *n*-hexano:acetato de etilo 6:4 revelação com ninidrina e reagente de Dragendorff. Após as 24h, evaporou-se o solvente orgânico. Obteve-se 35,3 mg de um óleo castanho (**36A**), com rendimento de 39,57%.



¹H RMN (400 MHz, D₂O) δ (ppm): 7,93-7,48 (m, 5H, H-Ar) 5,68-5,54 (m, 1H, H-2), 3,79-3,49 (m, 1H, H-5a), 3,48-3,19 (m, 2H, H-5b e H-3a), 2,53-2,18 (m, 2H, H-3b e H-4a), 1,93-1,74 (m, 1H, H-4b); **LC-MS:** m/z 191 [M+H]⁺, 381 [2M+H]⁺.

IV.9.2. Por remoção do grupo protetor Cbz



Num balão de fundo redondo equipado com agitador magnético adicionou-se 26,1 mg do composto (S)-2-benzamidopirrolidina-1-carboxilato de benzilo (**28**) (1 eq, 0,37 mmol), 29,15 mg de Pd/C (1 eq, 2,75 mmol) e 5 mL de etanol. A reação decorreu por 16 horas, em atmosfera de H₂. Após esse tempo, filtrou-se gravitacionalmente a mistura e o filtrado foi evaporado à securo, tendo-se obtido 5,8 mg de um sólido castanho, correspondente essencialmente a benzamida.

IV (NaCl) $\nu_{\text{máx}}$ (cm⁻¹): 3366 (NH), 3175 (CH aromáticos), 2918 (CH alifáticos), 1648 (NC(=O)Ph), 1623 (H₂NC(=O)Ph). **¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm):** (benzamida) 7,82-7,80 (m, 2H, H-3, H-7) 7,45-7,38 (m, 3H, H-4, H-5, H-6), 6,30 (sl, 2H, NH₂). **¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) σ (ppm):** (vestígios do composto **36**) 8,02-8,00 (m, 2H, H-Ar), 7,54-7,48 (m, 3H, H-Ar), 5,76-5,70 (m, 1H, H-2), 3,54-3,47 (m, 1H, H-5a), 3,38-3,32 (m, 1H, H-5b), 2,54-2,44 (m, 1H, H-3a), 2,36-2,23 (m, 3H, H-3b e CH₂-4); **LC-MS FIA:** *m/z* 133,05 [C₈H₇NO]⁺, 98,08 [C₅H₁₀N₂]⁺, 70,07 [C₄H₈N]⁺, 55,04 [C₃H₅N]⁺.

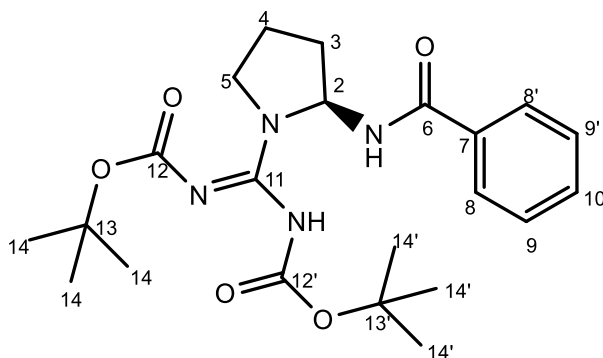
IV.9.3. Por remoção de grupo protetor Fmoc

Num balão de fundo redondo, equipado com agitador magnético e sob atmosfera inerte, dissolveu-se 50,9 mg de 9-fluorenilmetil (S)-2-benzamidopirrolidina-1-carboxilato (**30**) (1,0 eq, 0,12 mmol) em 0,25 ml de DMF seco. De seguida adicionou-se 12,18 μ L de piperidina. A reação teve a duração de 2h30min e foi acompanhada por c.c.f. com eluente de diclorometano 1% de metanol, revelação com ninidrina e reagente de Dragendorff. Ao fim desse tempo realizou-se extrações com acetato de etilo e diclorometano. As fases orgânica e aquosa foram evaporadas. Não foi obtido o composto esperado.

IV.10. Síntese de *N-terc*-butil ((2-benzamido-1-pirrolidinil)((*terc*-butoxicarbonil)imino)metil)carbamato (**32**)

Método A

Num balão de fundo redondo, equipado com agitador magnético, dissolveu-se 21,9 mg do composto (*S*)-*N*-2-pirrolidinil-benzamida (**36B**), (1 eq, 0,15 mmol) em 3,5 mL de dioxano e 1,7 mL de água. Sob agitação constante, adicionou-se 0,57 mL de solução aquosa de carbonato de sódio 2M. A mistura reacional foi arrefecida à temperatura de 0 °C e adicionou-se 40,15 mg de 1,3-



31

bis(*terc*-butoxicarbonil)-2-metil-2-tiopseudoureia (1,2 eq, 0,13 mmol). A reação decorreu à temperatura ambiente durante três dias e foi acompanhada por c.c.f. em diclorometano 7% de metanol, revelação com reagente de Dragendorff. Ao fim desse tempo evaporou-se o solvente orgânico e lavou-se a fase aquosa com acetato de etilo. Acidificou-se a fase aquosa com ácido clorídrico até pH 2. Extraiu-se com acetato de etilo, secou-se as fases orgânicas com sulfato de sódio anidro, filtrou-se e evaporou-se, tendo-se obtido um crude, purificado numa coluna seca de cromatografia a vácuo. A eluição foi feita usando misturas de diclorometano e metanol, por ordem crescente de polaridade (de 0% metanol até 2% de metanol – 50 ml de cada mistura). As frações foram recolhidas em tubos de ensaio e analisadas por c.c.f., tendo como eluente diclorometano:metanol 1% e revelação com reagente de Dragendorff. As frações foram levadas a evaporar à secura. Nenhuma das frações continha o produto pretendido.

Método B

Num balão de fundo redondo, equipado com agitador magnético, dissolveu-se 31,9 mg do composto (*S*)-*N*-2-pirrolidinil-benzamida (**36B**) (1 eq, 0,16 mmol) em 5 mL de dioxano e 2,5 mL de água. Sob agitação constante, adicionou-se 0,85 mL de uma solução de carbonato de sódio 2M (1 eq, 0,16 mmol). A mistura reacional foi arrefecida à temperatura de 0 °C e adicionou-se 63,8 mg de *N,N'*-di-Boc-1-*H*-pirazole-1-carboxamidine (1,2 eq, 0,20 mmol). A reação decorreu à temperatura de 50 °C durante 24 h e foi acompanhada por c.c.f. em diclorometano com 1% de metanol com revelação com reagente de Dragendorff. Ao fim desse tempo evaporou-se o solvente orgânico e extraiu-se com diclorometano. A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro, filtrada e evaporada à secura, não se obtendo o composto pretendido.

Método C

Num balão de fundo redondo, equipado com agitação magnética e atmosfera inerte, dissolveu-se 32,3 mg de (S)-N-2-pirrolidinil-benzamida (**36A**) (1 eq, 0,69 mmol) e 18,0 mg de carbonato de sódio (1 eq, 0,69 mmol) em 6 mL de 1,4-dioxano seco. A mistura reacional foi arrefecida até à temperatura de 0 °C e adicionou-se 52,3 mg de *N,N*-di-Boc-1-*H*-pirazole-1-carboxamidine (1 eq, 0,16 mmol). A reação decorreu durante 24h e foi monitorizada por c.c.f. com eluente de 1% de metanol em diclorometano, revelação com reagente de Dragendorff. O crude obtido foi purificado numa coluna de sílica gel eluída com *n*-hexano:acetato de etilo (4:6). Não se verificou a presença do composto pretendido em nenhuma fração.

Método D

Num balão de fundo redondo equipado com agitador magnético, dissolveu-se 43,6 mg de *N,N*-di(terc-butoxicarbonil)carbamimidóil)-L-prolinoil azida (**26**) (1 eq, 0,11 mmol) em 2 mL de tolueno seco. A mistura reacional foi aquecida até à temperatura de 65 °C, após atingir o refluxo, removeu-se o aquecimento e deixou-se reagir à temperatura ambiente por 1 h 30 min. A reação foi monitorizada por IV, observando-se o desaparecimento da banda da azida (2148 cm⁻¹). Após o desaparecimento completo da banda da azida, arrefeceu-se a mistura reacional até à temperatura de 0 °C e adicionou-se 33 µL de brometo de fenilmagnésio (1,5 eq, 0,7 mmol). A reação decorreu durante 3h e foi seguida por c.c.f. com eluente de diclorometano 1% de metanol, revelação com reagente de Dragendorff. Após esse tempo removeu-se o solvente orgânico a pressão reduzida, adicionou-se água destilada e efetuaram-se extrações com clorofórmio. A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro, filtrada e evaporada à securo. O crude foi purificado através de cromatografia em camada preparativa, com eluente de 0,5% metanol em diclorometano tendo-se obtido 14,2 mg do composto, *terc*-butil (*E*)-((2-benzoilpirrolidin-1-il)((terc-butoxicarbonil)amino)metileno)carbamato (**31**).

¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7,44-7,39 (m, 2H, H-Ar), 7,37-7,27 (m, 3H, Ar), 5,06-4,99 (m, 1H, H-2), 3,33-3,26 (m, 1H, H-5a), 3,17-3,06 (m, 1H, H-5b), 2,51-2,44 (m, 1H, H-3a), 2,03-1,89 (m, 3H, H-3b, CH₂-4) 1,60 e 1,49 (s, 18H, CH₃-14, CH₃-14').

Método E

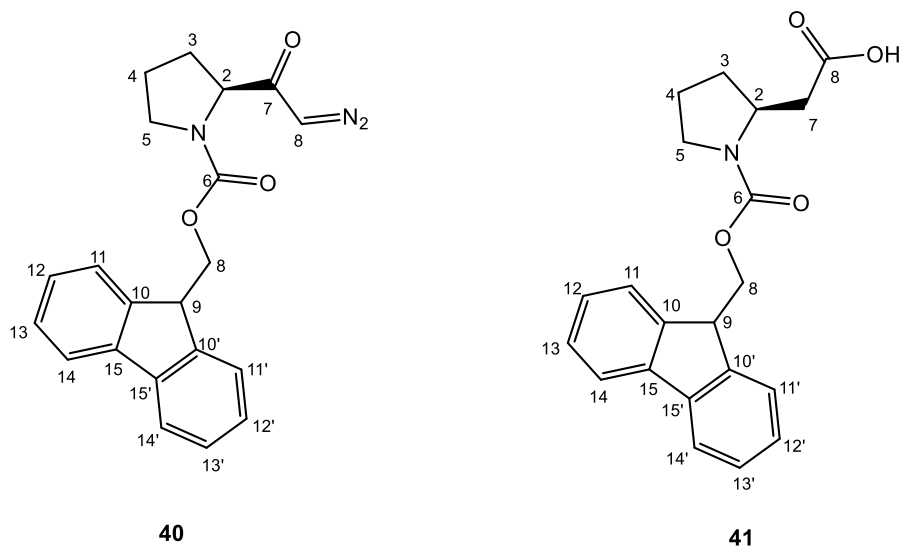
Num balão de fundo redondo, equipado com agitador magnético e sob atmosfera de N₂, adicionou-se 57,2 mg de 9-fluorenilmetil (S)-2-benzamidopirrolidina-1-carboxilato (**30**) (1,0 eq, 0,13 mmol), 51,1 mg de *N,N*'-di-Boc-1-*H*-pirazole-1-carboxamidine (1,2 eq, 0,16 mmol) e 1mL

de diclorometano seco. De seguida adicionou-se 6 μL de piperidina (0,45 eq, 0,062 mmol). A reação foi acompanhada por c.c.f. numa solução de 0,5 % metanol em diclorometano, revelação com reagente de Dragendorff e teve a duração de 72h. Após esse tempo evaporou-se os solventes orgânicos e o crude foi purificado numa coluna de cromatografia em sílica gel, com eluente de diclorometano 0,5% metanol. Nenhuma das frações continha o produto esperado.

Método F

Num balão de fundo redondo, equipado com agitador magnético e sob atmosfera de N_2 , adicionou-se 13,4 mg de *N*-*tert*-butil 1-carboxilato-(*S*)-2-benzamido pirrolidina (**27**) (1,0 eq, 0,04 mmol), 15,9 mg de 1,3-bis(terc-butoxicarbonil)-2-metil-2-tiopseudoureia (1,2 eq, 0,05 mmol) e 1 mL de diclorometano seco. De seguida adicionou-se 10,63 μL de TFA (0,13 mmol, 3 eq). A reação foi acompanhada por c.c.f. numa solução de 0,5 % metanol em diclorometano, revelação com reagente de Dragendorff e teve a duração de 72 h. Após esse tempo evaporou-se os solventes orgânicos e o crude foi purificado através de cromatografia em camada preparativa, com eluente de diclorometano 0,5% metanol. O composto pretendido não foi observado em nenhuma das frações recolhidas.

IV.11. Síntese do ácido 2-((*S*)-1-fluorenilmetoxycarbonil)-2-pirrolidinil)acético (**41**)



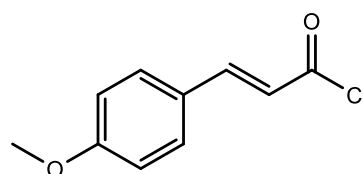
Num balão de fundo redondo, equipado com agitação magnética e sob atmosfera inerte, dissolveu-se 381,1 mg do composto 9-fluorenilmetil (*S*)-2-(clorocarbonil)pirrolidina-1-carboxilato (**21**) (1 eq, 1,07 mmol) em diclorometano seco e adicionou-se, gota-a-gota 4 ml de diazometano

(2 eq, 2,14 mmol) dissolvido em 1,4-dioxano. A reação decorreu durante 19 h. Após esse tempo, uma suspensão com 247,8 mg óxido de prata (1 eq, 1,07 mmol) e 426 mg tiosulfato de sódio (1,6 eq, 1,72 mmol) em 6 mL de água destilada, foi adicionada à solução. A mistura reacional foi aquecida, até à temperatura de 35 °C e a evolução da reação seguida por c.c.f. em diclorometano, revelação com ácido fosfomolibdico. Após 24 h, filtrou-se o resíduo de prata e acidificou-se o filtrado com ácido clorídrico 6M. Efetuaram-se várias extrações com éter etílico. A fase éterea foi seca com sulfato de sódio anidro, filtrada e evaporada à secura, tendo-se obtido 129,6 mg de crude, purificado numa coluna de cromatografia em sílica gel, eluente: diclorometano 0,5% de metanol. Obteve-se 19,8 mg de um óleo castanho, correspondente à mistura entre o composto 9-fluorenilmentil (S)-2-(2-diazoacetil)pirrolidina-1-carboxilato (**40**) e ácido 2-((S)-1-fluorenilmetoxycarbonil)-2-pirrolidinil)acético (**41**).

IV (NaCl) $\nu_{\text{máx}}$ (cm^{-1}): 3600-3070 (OH), 3069 (CH aromáticos), 2962-2856 (CH alifáticos), 2108 (N₂), 1750 (C=O), 1652 (C=O). **¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm):** 7,83-7,79 (m, 2H, H-Ar), 7,65-7,53 (m, 2H, H-Ar), 7,45-7,33 (m, 4H, H-Ar), 4,76-4,50 (m, 1H, H-2), 4,40-4,18 (m, 2H, CH₂-8), 3,78-3,36 (m, 3H, CH₂-5, H-9), 3,19-2,58 (m, 2H, CH₂-7), 2,31- 2,14 (m, 1H, H-3a), 2,15-1,90(m, 2H, H-3b, H-4a), 1,91-1,77 (m, 2H, H-4b). **GC-MS:** tr: 25,8 min. m/z 178 [C₁₄H₁₀]⁺. Os resultados obtidos estão de acordo com o descrito na literatura.³⁷

IV.12. Preparação de cloreto de (4-metoxifenil)acrilóilo (**42**)

Num balão de fundo redondo, equipado com agitador magnético, dissolveu-se 500,3 mg de ácido 4-metoxicinâmico (1 eq, 2,8 mmol) em 0,59 mL de cloreto de toinilo (2,9 eq, 8,14 mmol) . Deixou-se reagir em refluxo, a 80 °C, em atmosfera de N₂ durante 3 h. Após esse tempo, evaporou-se os compostos voláteis, a pressão reduzida, tendo-se obtido 551,3 mg de um óleo verde escuro (**42**), com rendimento de 99,86%.



42

IV (NaCl) $\nu_{\text{máx}}$ (cm^{-1}): 2966-2842 (CH alifáticos), 1733 (C=O) 1684 (C=C).

IV.13. Reações de proteção do ácido 3-hidroxi-4-metoxibenzoico

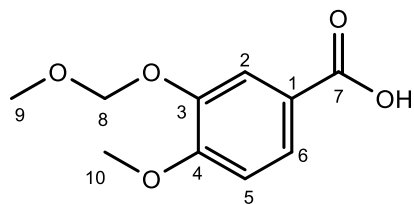
IV.13.1. Procedimento geral

Num balão de fundo redondo, equipado com agitador magnético, dissolveu-se o respetivo ácido 3-hidroxi-4-metoxibenzoico (1eq) em THF seco. A solução foi arrefecida à temperatura de 0 °C e adicionou-se trietilamina (2 eq), de seguida adicionou-se bromo metoximetano (MOMBr)

(1,2 eq). A reação decorreu à temperatura de 0 °C e sob atmosfera de N₂, durante 45 min. e foi acompanhada por c.c.f. com eluição de 2% de metanol em diclorometano, revelação com iodo. Ao fim desse tempo, adicionou-se celite e evaporou-se o solvente orgânico. A celite foi lavada, várias vezes, com *n*-hexano para remoção do composto.

IV.13.1.1. Preparação do ácido 4-metoxi-3-(metoximetoxi)benzoico (**49**)

De acordo com o procedimento geral acima descrito fez-se reagir 149,9 mg de ácido 3-hidroxi-4-metoxibenzoico (0,7 mmol) com 116,0 mg de MOMBr (0,9 mmol) na presença de 0,21 mL de trietilamina (1,54 mmol). Obteve-se 66,3 mg de óleo bege, correspondente ao composto (**49**), num rendimento de 35,05%.

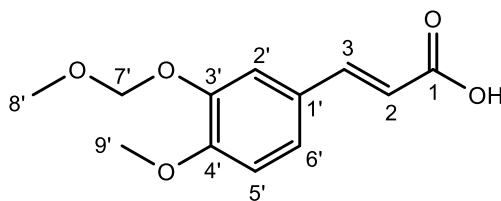


49

¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7,65 (dd, *J* = 8,39, 2,02 Hz, 1H, H-6), 7,62 (d, *J* = 1,94 Hz, 1H, H-2), 6,89 (d, *J* = 8,42 Hz, 1H, H-5), 5,44 (s, 2H, H-8), 3,94 (s, 3H, H-10), 3,53 (s, 3H, H-9).

IV.13.1.2. Preparação do ácido (*E*)-3-(4'-metoxi-3'-(metoximetoxi)fenil)acrílico (**50**)

De acordo com o procedimento geral acima descrito para a proteção do grupo hidroxilo, fez-se reagir 200,5 mg de ácido isoferúlico (1,03 mmol) com 154,4 mg de MOMBr (1,23 mmol) na presença de 0,26 mL de trietilamina (2,05 mmol). Obteve-se 157,0 mg de óleo bege, correspondente ao ácido **50**, num rendimento de 63,82%.



50

¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7,69 (dd, *J*=15,91, 6,63 Hz, 1H, H-2), 7,07-7,01 (m, 2H, H-2', H-6'), 6,91 (d, *J*=8,2 Hz, 1H, H-5'), 6,35-6,26 (m, 1H, H-3), 5,35 (m, 2H, H-7'), 3,89 (s, 3H, CH₃-9'), 3,49 (s, 3H, CH₃-8').

IV.14. Reações de *N* α -derivatização da L-arginina

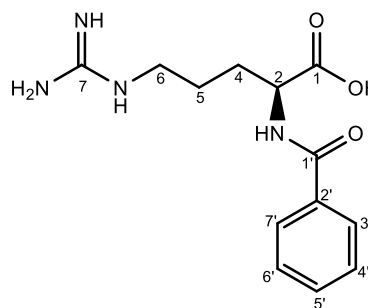
IV.14.1. Através da reação com cloretos de acilo

IV.14.1.1. Procedimento geral

Num balão de fundo redondo, equipado com agitador magnético, dissolveu-se L-arginina (1 eq) em água destilada. À solução, adicionou-se, gradualmente, o respectivo cloreto de acilo (1,1 eq) e carbonato de sódio (1,6 eq) dissolvido em 1,2 mL de água destilada. A adição, teve a duração de 1 h. A reação decorreu à temperatura ambiente, em agitação constante durante 24 h e foi acompanhada por c.c.f. numa mistura de diclorometano com 1% de metanol, revelação com ninidrina e reagente de Dragendorff. Após as 24 h, a mistura reacional foi acidificada com HCl 1 M, até pH 1 e filtrada. O filtrado foi extraído com éter etílico e a fase aquosa foi basificada com NaOH 1 M, até pH 8. A fase aquosa foi evaporada à secura, tendo-se obtido um crude purificado em coluna de cromatografia de fase reversa, RP-18 tendo como eluente misturas de água-metanol, por ordem decrescente de polaridade (de 0% metanol até 60% metanol). As frações foram analisadas por UV.

IV.14.1.1.1. Síntese da *N* α -Benzoil-L-arginina (**43**)

De acordo com o procedimento geral acima descrito para a *N*-derivatização da L-arginina, fez-se reagir 125,0 mg de L-arginina (1,18 mmol) com 151,6 mL de cloreto de benzoílo (1,30 mmol) na presença de carbonato de sódio. Após purificação do crude, juntou-se as frações com máximo de absorção de 228,5 nm, tendo-se obtido 240,8 mg de um sólido branco, com rendimento de 60,16 %.

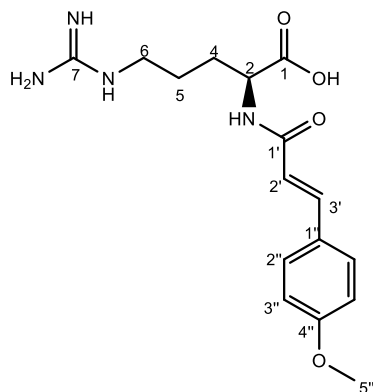


Pf: 284-287 °C (lit. 298 °C)⁴²; **IV (KBr) $\nu_{\text{máx}}$ (cm⁻¹):**

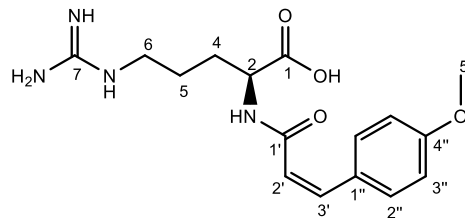
43

3600-2900 (OH), 3217 (NH), 3054 e 3025 (CH aromáticos), 2960 (CH alifáticos), 1680 (NC(=O)Ph), 1622 (C(=O)OH); **¹H RMN (400 MHz, D₂O) δ (ppm):** 7,83 (d, J = 7,28 Hz, 2H, H-3', H-7'), 7,65 (t, J = 7,45 Hz, 1H, H-5'), 7,55 (t, J = 7,54 Hz, 2H, H-4', H-6'), 4,42 (dd, J = 8,28, 4,88 Hz, 1H, H-2), 3,25 (t, J = 6,87 Hz, 2H, H-6), 2,05-1,96 (m, 1H, H-5a), 1,91-1,81 (m, 1H, H-5b), 1,75-1,67 (m, 2H, H-4).

IV.14.1.1.2. Síntese da (*E*)-(3-(4-Metoxifenil)acrilóil)-L-arginina (**44**)



44



45

De acordo com o procedimento geral acima descrito para a *N* α -derivatização da L-arginina, fez-se reagir 377,6 mg de L-arginina (1,79 mmol) com 387,2 mg de cloreto de (4-metoxifenil)acrilóil (**42**) (1,96 mmol) na presença de carbonato de sódio. Após purificação do crude juntou-se todas as frações com absorvância a 225 nm e 306 nm e ainda 270 nm, tendo-se obtido 46,5 mg de um sólido branco, correspondente à mistura entre (*E*)-(3-(4-metoxifenil)acrilóil)-L-arginina (**44**) e (*Z*)-(3-(4-metoxifenil)acrilóil)-L-arginina (**45**), rácio de 3:1.

IV (KBr) $\nu_{\text{máx}}$ (cm^{-1}): 3600-750 (OH), 3268 (NH), 3268-3174 (CH aromáticos), 2958-2835 (CH alifáticos), 1656 (NC(=O)C), 1602 (C(=O)OH), 1576 e 1512 (C=C); **LC-MS FIA:** m/z 335,2 [M+H]⁺, 669,3 [2M+H]⁺; **^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm):**

(*E*)-(3-(4-metoxifenil)acrilóil)-L-arginina (44**):** 7,59 (d, $J=8,49$ Hz, 2H, H-2''), 7,49 (d, $J=15,78$ Hz, 1H, H-2'), 7,03 (d, $J=8,42$ Hz, 2H, H-3''), 6,59 (d, $J=15,82$ Hz, 1H, H-3'), 4,32 (dd, $J=7,92, 5,12$ Hz, 1H, H-2), 3,86 (s, 3H, CH₃-5''), 3,21 (t, $J=6,80$ Hz, 2H, CH₂-6), 1,81-1,72 (m, 2H, CH₂-5), 1,68-1,61 (m, 3H, CH₂-4);

(*Z*)-(3-(4-metoxifenil)acrilóil)-L-arginina (45**):** 7,38 (d, $J=8,59$ Hz, 2H, H-2''), 6,98 (d, $J=8,47$ Hz, 1H, H-3''), 6,88 (d, $J=12,30$ Hz, 2H, H-2'), 6,06 (d, $J=12,36$ Hz, 1H, H-3'), 4,17 (dd, $J=8,25, 4,58$ Hz, 1H, H-2), 3,83 (s, 3H, CH₃-5''), 3,07 (t, $J=6,52$ Hz, 2H, CH₂-6), 1,96-1,87 (m, 2H, CH₂-5); 1,83-1,70 (m, 3H, CH₂-4) (anexo 19).

IV.14.2. Através da reação com ácidos carboxílicos e recurso a reagente de acoplamento

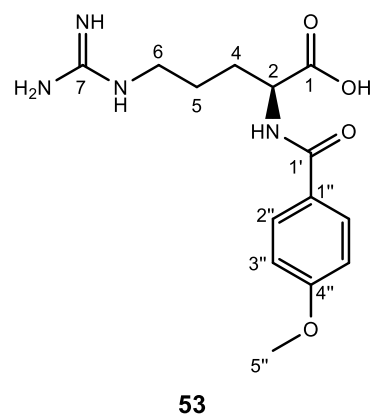
IV.14.2.1. Procedimento geral

Num balão de fundo redondo, equipado com agitação magnética dissolveu-se o respetivo ácido carboxílico (1,25 eq) em diclorometano seco e de seguida adicionou-se DCC (1,25 eq). À

temperatura ambiente e atmosfera inerte, deixou-se reagir por 4 h. Acompanhou-se a reação através de c.c.f. com eluente de diclorometano 2% de metanol, revelação com ninidrina. Após esse tempo, adicionou-se DMAP (0,125 eq) e *N*-hidroxisuccinimida (1,25 eq). Deixou-se reagir por 24 h e filtrou-se o precipitado formado; ao filtrado adicionou-se L-arginina (1 eq) dissolvida em 1 mL de DMF seco. A reação foi mantida em agitação, atmosfera inerte durante 3 dias e foi acompanhada por c.c.f. com eluente de 2% de metanol em diclorometano, revelação com reagente de Dragendorff. Ao fim desse tempo, evaporou-se os solventes orgânicos à secura e o sólido resultante foi lavado com diclorometano e metanol.

IV.14.2.1.1. Síntese da (4-metoxibenzoil)arginina (**53**)

Através do procedimento geral descrito em IV.14.2.1, fez-se reagir 249,8 mg de L-arginina (1,43 mmol) com 272,1 mg de ácido 4-metoxibenzoico (1,79 mmol). O crude resultante da extração com metanol foi purificado por uma coluna de cromatografia em fase reversa, Rp-18, tendo como eluente misturas de água-metanol, por ordem decrescente de polaridade da mistura (de 0% metanol a 60% de metanol – 50 mL cada mistura). As frações recolhidas foram analisadas por UV; foram juntas as frações com máximos de absorvâncias de 252 e 255 nm. Obteve-se 137,8 mg de um sólido branco (**53**), com rendimento de 44,69%.



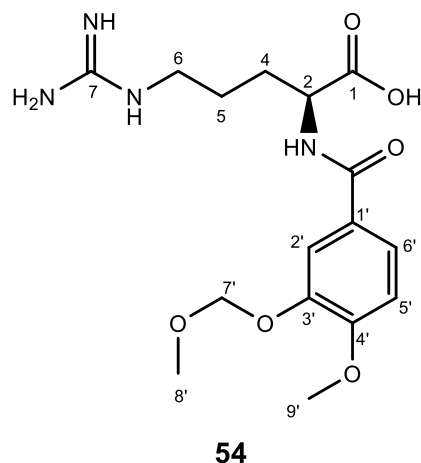
IV (KBr) $\nu_{\text{máx}}$ (cm^{-1}): 3600-2500 (OH), 3183 (CH aromáticos), 2960-2862 (CH alifáticos), 1631 (NC(=O)C), 1607 (C(=O)OH); **^1H RMN (400 MHz, CD_3OD) δ (ppm):** 7,78 (d, $J=8,76$ Hz, 2H, H-2''), 6,88 (d, $J=8,78$ Hz, 2H, H-3''), 4,45 (dd, $J=8,12, 4,85$ Hz Hz, H-2), 3,79 (s, 3H, H-5''), 3,23-3,12 (m, 2H, CH_2 -6), 2,01-1,92 (m, 1H, H-5a), 1,88-1,82 (m, 1H, H-5b), 1,68-1,64 (m, 2H, CH_2 -4). **LC-MS FIA:** m/z 309,1 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 317,3 $[2\text{M}+\text{H}]^+$.

IV.14.2.1.2. Síntese da (4-metoxi-3-(metoximetoxi)benzoil) arginina (**54**)

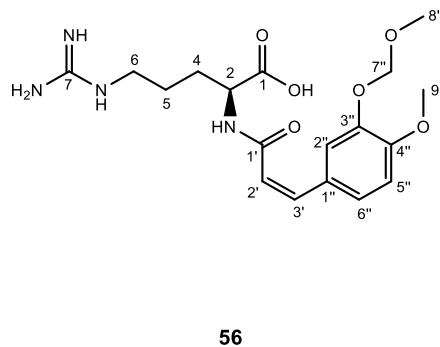
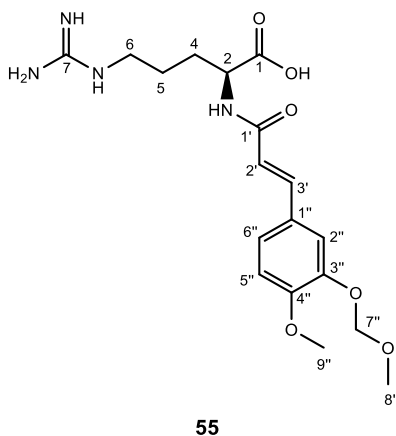
Através do procedimento geral descrito em IV.14.2.1, fez-se reagir 41,8 mg de L-arginina (0,23 mmol) com 60 mg de ácido 4-metoxi-3-(metoximetoxi)benzoico (**49**) (0,29 mmol). O crude resultante da extração com metanol foi purificado por cromatografia em camada preparativa, tendo como eluente mistura de 10% de metanol em diclorometano. Obteve-se 7,5 mg de um sólido castanho (**54**), com rendimento de 8,48%.

Pf: 171-180 °C; **IV (KBr) $\nu_{\text{máx}}$ (cm^{-1}):** 3600-330 (OH), 3329 (NH), 2929-2850 (CH alifáticos), 1714 (NC(=O)C), 1621 (C(=O)OH); **$^1\text{H RMN}$ (400 MHz, CDCl_3)**

δ (ppm): 7,68 (dd, $J=8,40$, 1,97 Hz, 1H, H-6'), 7,63 (d, $J=1,96$ Hz, 1H, H-2'), 6,90 (d, $J=8,41$ Hz, 1H, H-5'), 5,75 (s, 1H, NH), 5,45 (s, 2H, H-7'), 4,16-4,05 (m, 1H, H-2), 3,96 (s, 3H, H-9'), 3,53 (s, 3H, H-8'), 1,97-1,88 (m, 2H, CH_2 -6), 1,73-1,65 (m, 2H, CH_2 -5), 1,64-1,59 (m, 2H, CH_2 -4).



IV.14.2.1.3. Síntese da (*E*)-(3-(4-metoxi-3-(metoximetoxi)fenil)acrilil) arginina (**55**)



Através do procedimento geral descrito em IV.14.2.1, fez-se reagir 86,3 mg de L-arginina (0,049 mmol) com 157 mg de ácido (*E*)-3-(4'-metoxi-3'-(metoximetoxi)fenil) acrílico (**50**) (0,065 mmol). O crude resultante da extração com metanol foi purificado através de coluna de cromatografia em fase reversa, RP-18, tendo como eluente misturas de água-metanol, por ordem decrescente de polaridade (de 0% metanol a 60% de metanol – 50 mL cada mistura). As frações recolhidas foram analisadas por UV; foram juntas as frações com máximos de absorvâncias nos comprimentos de onda de 215, 234, 292 e 325 nm. Obteve-se 103,8 mg de um óleo amarelo, correspondente à mistura entre os compostos (*E*)-(3-(4-metoxi-3-

(metoximetoxi)fenil)acryloil)arginina (**55**) e (Z)-(3-(4-metoxi-3-(metoximetoxi)fenil)acryloil)arginina (**56**), num rácio de 1:0,46.

¹H RMN (400 MHz, CD₃OD) δ (ppm):

(E)-(3-(4-metoxi-3-(metoximetoxi)fenil)acryloil)arginina (**55**): 7,72-7,68 (m, 1H, H-3'), 7,29-7,24 (m, 1H, H-5''), 7,19-7,12 (m, 2H, H-2'', H-6''), 6,51 (d, *J*=15,92 Hz, 1H, H-2'), 5,41-5,35 (m, 2H, H-7''), 4,71-4,68 (m, 1H, H-2), 3,90 (s, 3H, CH₃-9''), 3,50 (s, 3H, CH₃-8''), 3,37-3,36 (m, 2H, CH₂-6), 1,90-1,83 (m, 4H, CH₂-4, CH₂-5).

(Z)-(3-(4-metoxi-3-(metoximetoxi)fenil)acryloil)arginina (**56**): 7,71-7,69 (m, 1H, H-2''), 7,29-7,24 (m, 1H, H-5''), 7,12-7,07 (m, 2H, H-6''), 6,92 (d, *J*=12,65 Hz, 1H, H-2'), 5,92 (d, *J*=13,04 Hz, 1H, H-3') 5,37-5,35 (m, 2H, H-7''), 4,75-4,72 (m, 1H, H-2), 3,85 (s, 3H, CH₃-9''), 3,50 (s, 3H, CH₃-8''), 3,35-3,33 (m, 2H, CH₂-6), 1,62-1,58 (m, 4H, CH₂-4, CH₂-5) (Anexo 20).

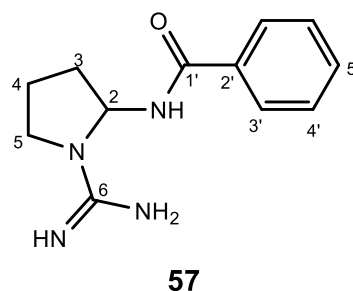
IV.15. Reações de descarboxilação oxidativa

IV.15.1. Procedimento geral

Num balão de fundo redondo, equipado com agitação magnética, adicionou-se a respetiva, arginina *N*-derivatizada (1 eq) e diclorometano seco. À mistura reacional adicionou-se DIB (2 eq) e de seguida, adicionou-se iodo (0,5 eq). A mistura reacional foi aquecida até atingir o refluxo a 38 °C, reagiu a essa temperatura, em atmosfera inerte, agitação constante durante 24 h e foi monitorizada por c.c.f. em diclorometano com 20% metanol, revelação com reagente de Dragendorff. Ao fim desse tempo, evaporou-se o solvente orgânico e o sólido resultante foi lavado várias vezes com diclorometano. Desprezou-se a fase orgânica e o sólido obtido foi purificado numa coluna de cromatografia de fase reversa, RP-18 tendo como eluente misturas de água-metanol por ordem decrescente de polaridade da mistura (de 0% metanol até 60% metanol). As frações foram analisadas por UV.

IV.15.1.1. Síntese da *N*-(1-Carbamimidoilpirrolidina-2-il)benzamida (**57**)

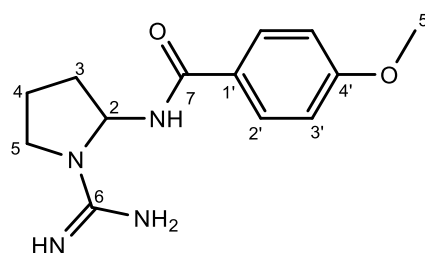
De acordo com o procedimento geral acima descrito IV.15.1, fez-se reagir 50 mg de *N*_α-Benzoil-L-arginina (**43**) (0,17 mmol), com 115,3 ml de DIB (0,35 mmol) na presença de iodo (44,7 mg, 0,14 mmol). Após a purificação do crude, juntou-se as frações com máximo de absorvância de 226 nm. Obteve-se 11,3 mg de um sólido branco, correspondente à mistura entre o composto pretendido, *N*-(1-Carbamimidoilpirrolidina-2-il)benzamida (**57**) e material de partida (**43**), num rácio de 1:0,7.



IV (KBr) $\nu_{\text{máx}}$ (cm^{-1}): 3436 (NH), 2918 (CH aromáticos), 2850 (CH alifáticos), 1627 (NC(=O)); **$^1\text{H RMN}$ (400 MHz, CD_3OD) δ (ppm):** 7,89 (d, $J=7,21$ Hz, 2H, H-3'), 7,61-7,52 (m, 1H, H-5'), 7,51-7,45 (m, 2H, H-4'), 5,97-5,92 (m, 1H, H-2), 3,29-3,23 (m, 2H, H-5), 2,11-2,04 (m, 1H, H-3a), 1,95-1,85 (m, 1H, H-3b), 1,80-1,69 (m, 2H, CH_2 -4). **LC-MS FIA:** m/z 233 $[\text{M}+\text{H}]^+$

IV.15.1.2. Síntese da *N*-(1-carbamimidoilpirrolidin-2-il)-4-metoxi benzamida (**58**)

De acordo com o procedimento geral acima descrito IV.15.1, fez-se reagir 62,4 mg de (4-metoxibenzoil)arginina (**53**) (0,18 mmol) com 113,6 mg de diacetato de iodobenzeno (0,36 mmol) na presença de iodo sublimado. Após a purificação, juntou-se as frações que absorviam nos comprimentos de onda de 253 nm, obtendo-se 5,85 mg de sólido branco, correspondente à mistura entre o composto *N*-(1-carbamimidoilpirrolidin-2-il)-4-metoxi benzamida (**58**) e material de partida (**53**), num rácio de 1:0,2.

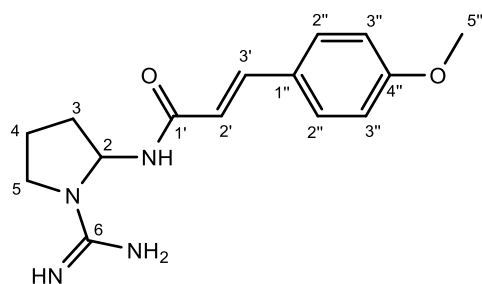


58

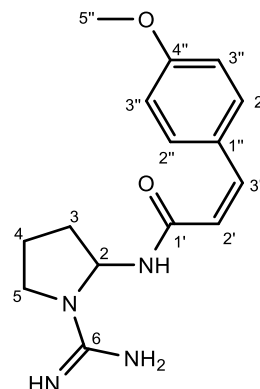
Pf: 63-66 °C; **IV (KBr) $\nu_{\text{máx}}$ (cm^{-1}):** 3370 (NH), 2957, 2918, 2850, 1642 (C=O); **$^1\text{H RMN}$ (400 MHz, CD_3OD) δ (ppm):** 7,87 (d, $J=8,77$ Hz, 2H, H-2'), 7,02 (d, $J=8,74$ Hz, 2H, H-3'), 5,95 (d, $J=5,00$ Hz, 1H, H-2), 3,87 (s, 3H, CH_3 -5'), 3,53-3,44 (m, 2H, CH_2 -5), 2,42-2,37 (m, 2H, CH_2 -3), 2,16-2,14 (m, 2H, CH_2 -4); **LC-MS FIA:** m/z 263,2 $[\text{M}+\text{H}]^+$

IV.15.1.3. Síntese da (*E*)-*N*-(1-Carbamimidoilpirrolidin-2-il)-3-(4-metoxifenil) acrilamida (**59**)

De acordo com o procedimento geral acima descrito IV.15.1, fez-se reagir 42 mg da mistura de (*E*)-(3-(4-metoxifenil)acrilóil)-L-arginina (**44**) e (*Z*)-(3-(4-metoxifenil)acrilóil)-L-arginina (**45**) (0,18 mmol) com 69,3 mg de diacetato de iodobenzeno (0,22 mmol) na presença de iodo. Após a purificação do crude, juntou-se as frações que absorviam nos comprimentos de onda de 225 nm, obtendo-se 15,8 mg de sólido branco, correspondente a mistura entre o composto (*E*)-*N*-(1-Carbamimidoilpirrolidin-2-il)-3-(4-metoxifenil) acrilamida (**59**) e o composto (*Z*)-*N*-(1-Carbamimidoilpirrolidin-2-il)-3-(4-metoxifenil) acrilamida (**60**), num rácio de 1:0,17.



59



60

IV (KBr) $\nu_{\text{máx}}$ (cm^{-1}): 3352 (NH), 3193 (CH aromáticos), 2922 e 2852 (CH alifáticos), 1660 (C=O); **LC-MS FIA:** m/z 330 [M+AF-H]⁻, 367 [M+Br]⁻; **^1H RMN (400 MHz, CD_3OD) σ (ppm):**

(*E*)-*N*-(1-Carbamimidoilpirrolidin-2-il)-3-(4-metoxifenil) acrilamida (59): 7,51-7,47 (m, 2H, H-2''), 6,95-6,90 (m, 2H, H-3''), 6,91 (d, $J=15,72$ Hz, 1H, H-2'), 3,81 (s, 3H, H-5''), 3,26-3,16 (m, 2H, CH_2 -5), 1,84-1,72 (m, 2H, CH_2 -3), 1,72-1,64 (m, 2H, CH_2 -4).

(*Z*)-*N*-(1-Carbamimidoilpirrolidin-2-il)-3-(4-metoxifenil) acrilamida (60): 7,35 (d, $J=8,57$ Hz 2H, H-Ar), 6,95-6,90 (m, 5H, H-3''), 6,70 (d, $J=12,79$ Hz, 1H, H-2'), 6,05-5,94 (m, 1H, H-2), 3,79 (s, 3H, H-5''), 3,26-3,16 (m, 5H, CH_2 -5), 2,01-1,96 (m, 2H, CH_2 -3), 1,95-1,85 (m, 2H, CH_2 -4) (Anexo 21).

Bibliografia

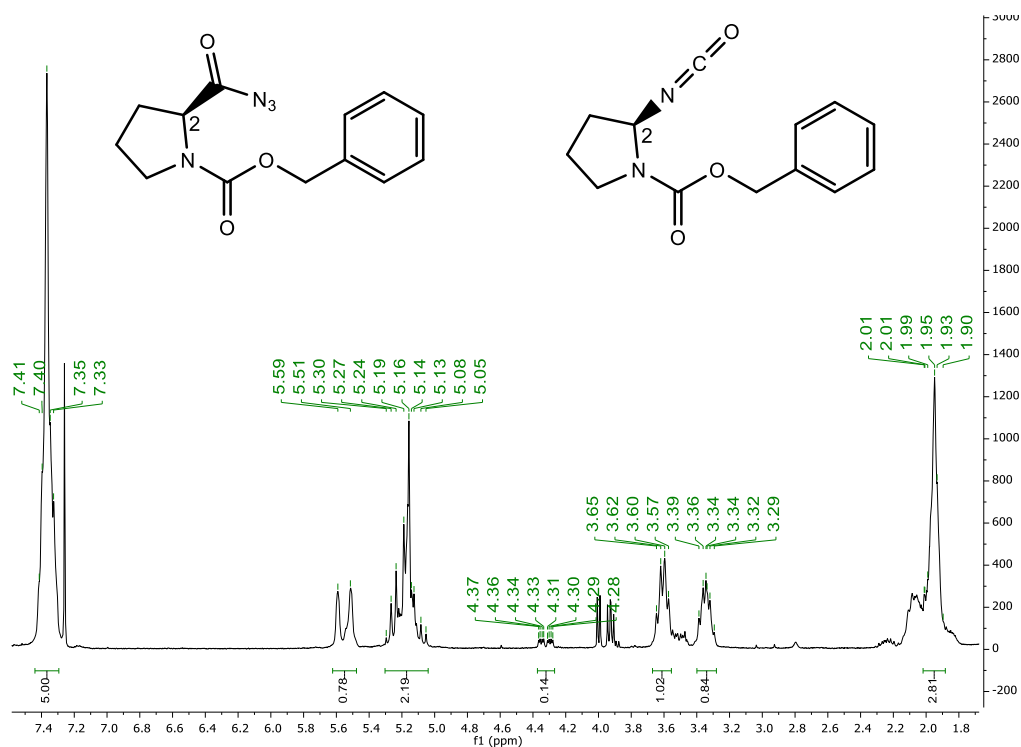
1. (a) Lahlou, M., The Success of Natural Products in Drug Discovery. *Pharmacology & Pharmacy* **2013**, 4 (3A), 15; (b) Lahlou, M., Screening of natural products for drug discovery. *Expert Opinion on Drug Discovery* **2007**, 2 (5), 697-705.
2. Damasceno, J. L.; Oliveira, P. F.; Miranda, M. A.; Leandro, L. F.; Acesio, N. O.; Ozelin, S. D.; Bastos, J. K.; Tavares, D. C., Protective effects of Solanum cernuum extract against chromosomal and genomic damage induced by methyl methanesulfonate in Swiss mice. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **2016**, 83, 1111-1115.
3. (a) Bouzada, M. L. M.; Fabri, R. L.; Nogueira, M.; Konno, T. U. P.; Duarte, G. G.; Scio, E., Antibacterial, cytotoxic and phytochemical screening of some traditional medicinal plants in Brazil. *Pharmaceutical Biology* **2009**, 47 (1), 44-52; (b) Vieira, M. L. A.; Hughes, A. F. S.; Gil, V. B.; Vaz, A. B. M.; Alves, T. M. A.; Zani, C. L.; Rosa, C. A.; Rosa, L. H., Diversity and antimicrobial activities of the fungal endophyte community associated with the traditional Brazilian medicinal plant Solanum cernuum Vell. (Solanaceae). *Canadian Journal of Microbiology* **2012**, 58 (1), 54-66.
4. Lopes, L. C.; Roman, B.; Medeiros, M. A.; Mukhopadhyay, A.; Utrilla, P.; Galvez, J.; Maurino, S. G.; Moltiva, V.; Lourenco, A.; Feliciano, A. S., Cernumidine and isocernumidine, new type of cyclic guanidine alkaloids from Solanum cernuum. *Tetrahedron Letters* **2011**, 52 (48), 6392-6395.
5. Observation, G. C. Estimated number (incidente and mortality), both sexes, (top 10 cancer sites) in 2012. http://gco.iarc.fr/today/online-analysis-dual-bars?mode=cancer&mode_population=continents&population=901&sex=0&cancer=29&type=0&statistic=0&prevalence=0&color_palette=default (accessed 26, August).
6. Eliel, E. L.; Wilen, S. H., *Stereochemistry of Organic Compounds*. Wiley India Pvt. Limited: 2008.
7. Nic, M.; Jirat, J.; Nomenclature, D. o. C.; Pure, S. R. I. U. o.; Chemistry, A.; Kosata, B., *IUPAC goldbook*. IUPAC: 2006.
8. Clayden, J.; Greeves, N.; Warren, S., *Organic Chemistry*. OUP Oxford: 2012.
9. Rouf, A.; Taneja, S. C., Synthesis of Single-enantiomer Bioactive Molecules: A Brief Overview. *Chirality* **2014**, 26 (2), 63-78.
10. Caldwell, J., Do single enantiomers have something special to offer? *Human Psychopharmacology-Clinical and Experimental* **2001**, 16, S67-S71.

11. Reetz, M. T.; Lee, W. K., New uses of amino acids as chiral building blocks in organic synthesis. *Organic Letters* **2001**, 3 (20), 3119-3120.
12. Laval, G.; Golding, B. T., One-pot sequence for the decarboxylation of α -amino acids. *Synlett* **2003**, 2003 (04), 0542-0546.
13. (a) Boto, A.; Hernandez, R.; Suarez, E., Tandem radical decarboxylation-oxidation of amino acids: A mild and efficient method for the generation of N-acyliminium ions and their nucleophilic trapping. *Journal of Organic Chemistry* **2000**, 65 (16), 4930-4937; (b) Boto, A.; Herna, R.; Sua, E., Oxidative decarboxylation of α -amino acids: A mild and efficient method for the generation of N-acyliminium ions. *Tetrahedron letters* **1999**, 40 (32), 5945-5948.
14. (a) Barton, D. H.; Crich, D.; Motherwell, W. B., New and improved methods for the radical decarboxylation of acids. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications* **1983**, (17), 939-941; (b) Barton, D. H.; Hervé, Y.; Potier, P.; Thierry, J., Reductive radical decarboxylation of amino-acids and peptides. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications* **1984**, (19), 1298-1299.
15. Tan, C. H.; Coles, M., The Chemistry of Guanidine, Guanidinium, and Guanidinate Compounds. *Australian Journal of Chemistry* **2014**, 67 (7), 963-964.
16. Feichtinger, K.; Zapf, C.; Sings, H. L.; Goodman, M., Diprotected triflylguanidines: A new class of guanidinylation reagents. *Journal of Organic Chemistry* **1998**, 63 (12), 3804-3805.
17. Powell, D. A.; Ramsden, P. D.; Batey, R. A., Phase-transfer-catalyzed alkylation of Guanidines by alkyl halides under biphasic conditions: A convenient protocol for the synthesis of highly functionalized guanidines. *Journal of Organic Chemistry* **2003**, 68 (6), 2300-2309.
18. Kocienski, P. J., *Protecting Groups*, 3rd Edition 2005. Thieme: 2014.
19. Wuts, P. G. M.; Greene, T. W., *Greene's Protective Groups in Organic Synthesis*. Wiley: 2012.
20. Vellemae, E.; Stepanov, V.; Maeorg, U., Mild Approach to the Deprotection of Troc from Protected Amines Using Mischmetal and TMSCl. *Synthetic Communications* **2010**, 40 (22), 3397-3404.
21. Chen, C. C.; Rajagopal, B.; Liu, X. Y.; Chen, K. L.; Tyan, Y. C.; Lin, F.; Lin, P. C., A mild removal of Fmoc group using sodium azide. *Amino Acids* **2014**, 46 (2), 367-374.
22. Montalbetti, C.; Falque, V., Amide bond formation and peptide coupling. *Tetrahedron* **2005**, 61 (46), 10827-10852.
23. Valeur, E.; Bradley, M., Amide bond formation: beyond the myth of coupling reagents. *Chemical Society Reviews* **2009**, 38 (2), 606-631.

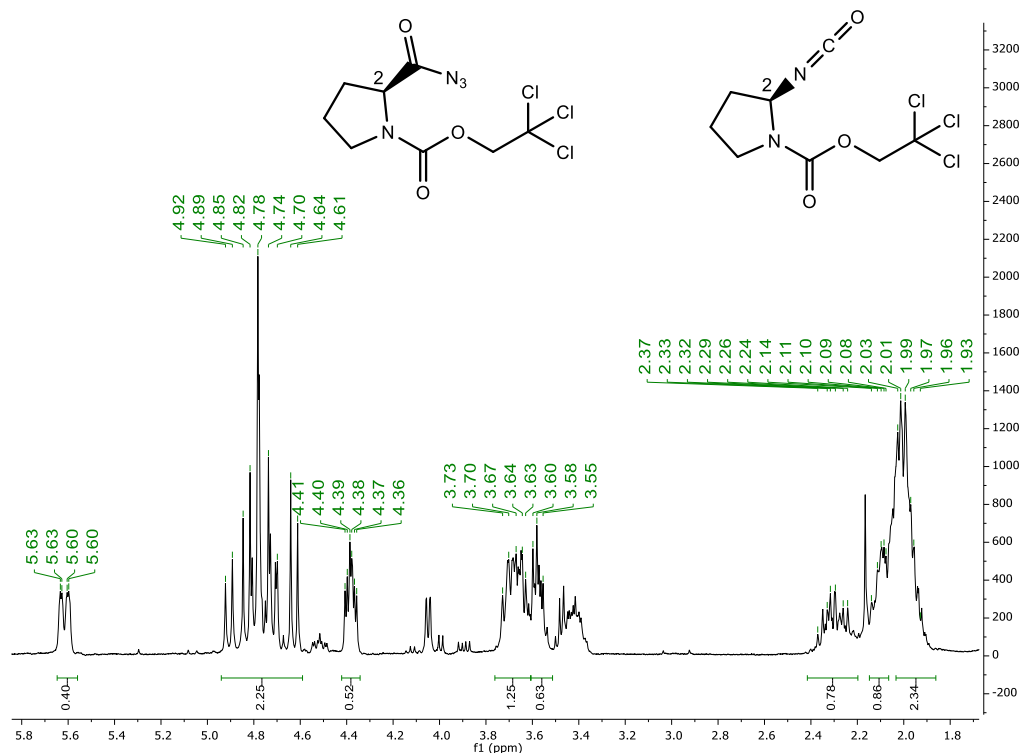
24. Gabriel, L. P.; Zavaglia, C. A. C.; Jardini, A. L.; Dias, C.; Maciel, R., Isocyanates as Precursors to Biomedical Polyurethanes. In *Ibic2014: 4th International Conference on Industrial Biotechnology*, Bardone, E.; Bravi, M.; Keshavarz, T., Eds. 2014; Vol. 38, pp 253-+.
25. Patai, S., *Chemistry of cyanates and their thio derivatives*. J. Wiley: 1977.
26. Wang, Z., *Comprehensive Organic Name Reactions and Reagents*, 3 Volume Set. Wiley: 2009.
27. Smith, M. B.; March, J., *March's Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms, and Structure*. Wiley: 2007.
28. Gilman, H.; Kinney, C. R., The Mechanism of the Reaction of Isocyanates and Isothiocyanates with the Grignard Reagent. *Journal of the American Chemical Society* **1924**, 46 (2), 493-497.
29. Drake, B.; Patek, M.; Lebl, M., A convenient preparation of monosubstituted N, N'-di (Boc)-protected guanidines. *Synthesis* **1994**, 1994 (06), 579-582.
30. Mamede, R. M. Estratégias sintéticas para a preparação de análogos do alcalóide cernumidina. 2016.
31. Garcia-Egido, E.; Fernandez-Suarez, M.; Munoz, L., Synthesis of carbamoyl azides from primary amines and carbon dioxide under mild conditions. *Journal of Organic Chemistry* **2008**, 73 (7), 2909-2911.
32. Jiao, N., *Nitrogenation Strategy for the Synthesis of N-containing Compounds*. Springer Singapore: 2016.
33. Guo, G.; Wu, Y.; Zhao, X.; Wang, J.; Zhang, L.; Cui, Y., Polymerization of L-proline functionalized styrene and its catalytic performance as a supported organocatalyst for direct enantioselective aldol reaction. *Tetrahedron: Asymmetry* **2016**, 27 (16), 740-746.
34. Luca, O. R.; Fenwick, A. Q., Organic reactions for the electrochemical and photochemical production of chemical fuels from CO₂—the reduction chemistry of carboxylic acids and derivatives as bent CO₂ surrogates. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **2015**, 152, 26-42.
35. Mazza, A.; Beccalli, E. M.; Contini, A.; Garcia-Argaez, A. N.; Dalla Via, L.; Gelmi, M. L., A new scaffold of topoisomerase I inhibitors: Design, synthesis and biological evaluation. *European journal of medicinal chemistry* **2016**, 124, 326-339.
36. Bachmann, W.; Struve, W., The Aldol-Ester Synthesis. *Organic Reactions* **2004**, 1, 38-62.

37. Ellmerer-Müller, E. P.; Brössner, D.; Maslouh, N.; Takó, A., Synthesis of N-[(9H-Fluoren-9-yl) methoxy] carbonyl}-Protected (Fmoc) β -Amino Acids (= homo- α -amino acids) by direct homologation. *Helvetica chimica acta* **1998**, 81 (1), 59-65.
38. Armarego, W. L. F., *Purification of Laboratory Chemicals*. Elsevier Science: 2017.
39. (a) Roane, J.; Wippich, J.; Ramgren, S. D.; Krische, M. J., Synthesis of the C(1)-C(13) Fragment of Leiodermatolide via Hydrogen-Mediated C-C Bond Formation. *Organic Letters* **2017**, 19 (24), 6634-6637; (b) Huy, P.; Neudörfl, J. r.-M.; Schmalz, H.-G. n., A practical synthesis of trans-3-substituted proline derivatives through 1, 4-addition. *Organic letters* **2010**, 13 (2), 216-219.
40. Mazzini, C.; Sambri, L.; Regeling, H.; Zwanenburg, B.; Chittenden, G. J. F., Enantiospecific syntheses of (R)- and (S)-proline and some derivatives from D-glucono-1,5-lactone. *Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions 1* **1997**, (22), 3351-3356.
41. Boyd, S. A.; Thompson, W. J., STEREOSELECTIVE SYNTHESIS OF DESMETHOXY-(+)-VERRUCULOGEN TR-2. *Journal of Organic Chemistry* **1987**, 52 (9), 1790-1794.
42. Hitchcock, M.; Smith, J., Comparative detoxication. 13. Detoxication of aromatic acids in arachnids: arginine, glutamic acid and glutamine conjugations. *Biochemical Journal* **1964**, 93 (2), 392.

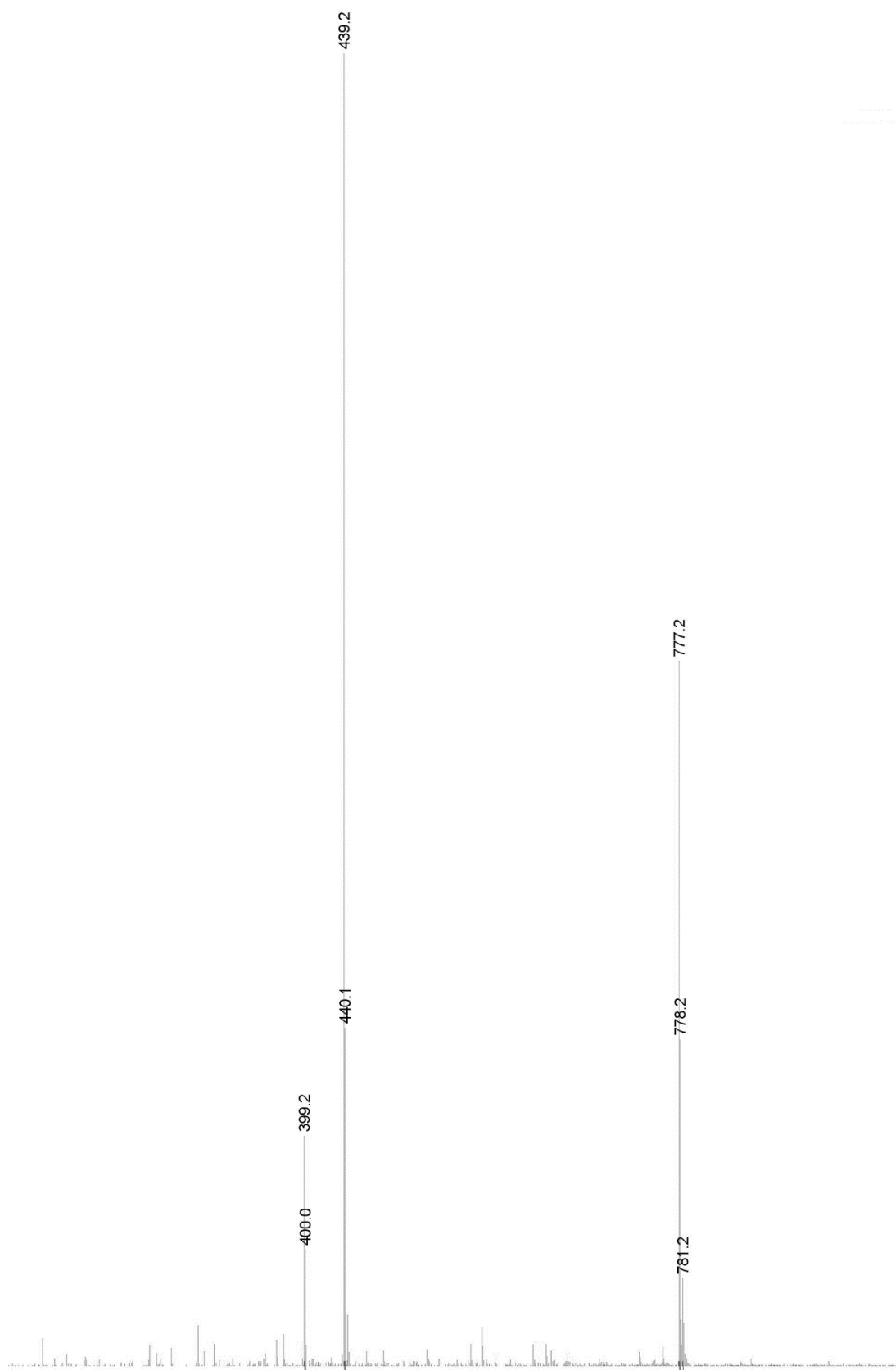
Anexos



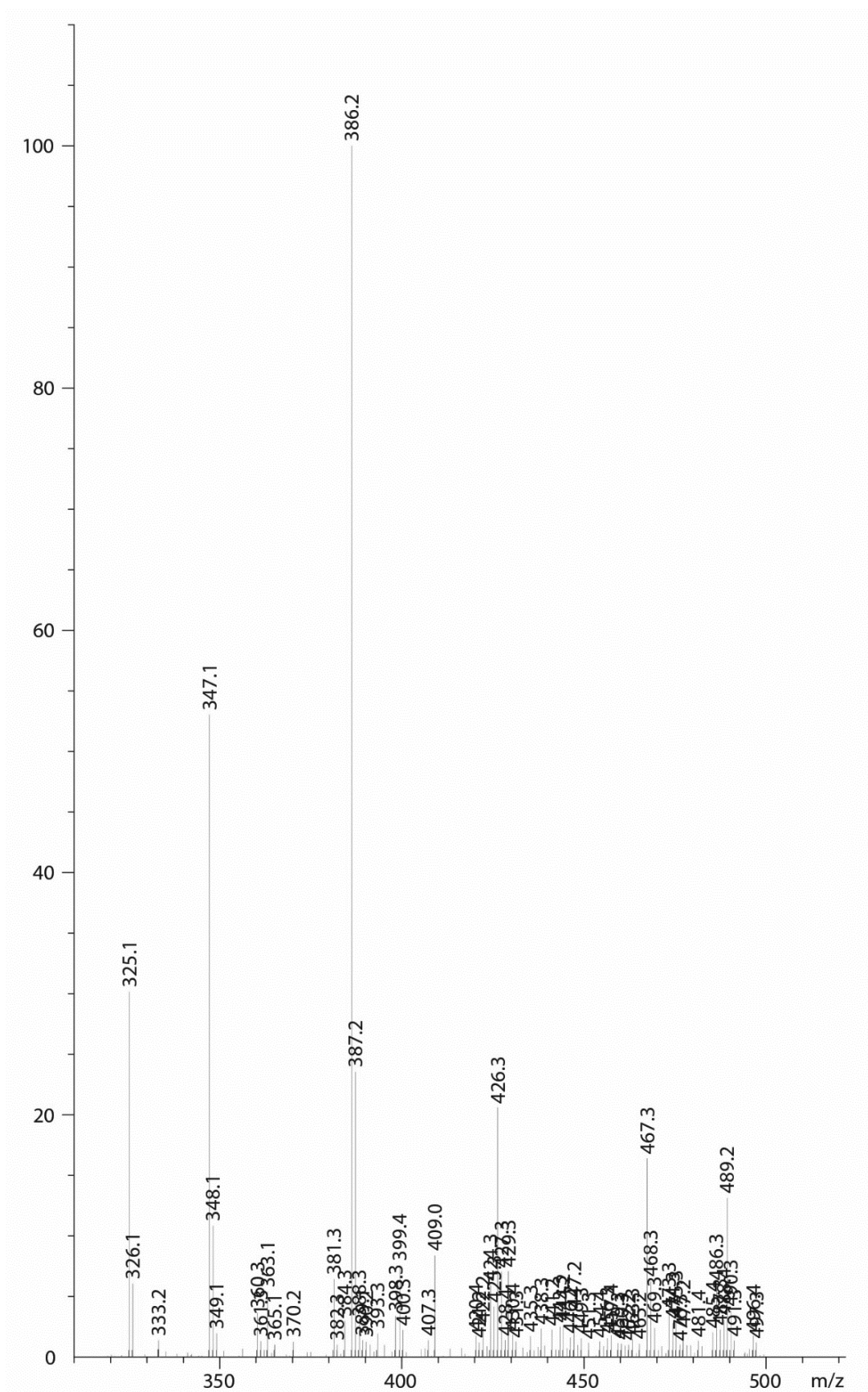
Anexo 1 - Espectro de ^1H -RMN dos compostos **13** (N-Cbz-aziridina) e respectivo isocianato **62** (N-Cbz-isocianato).



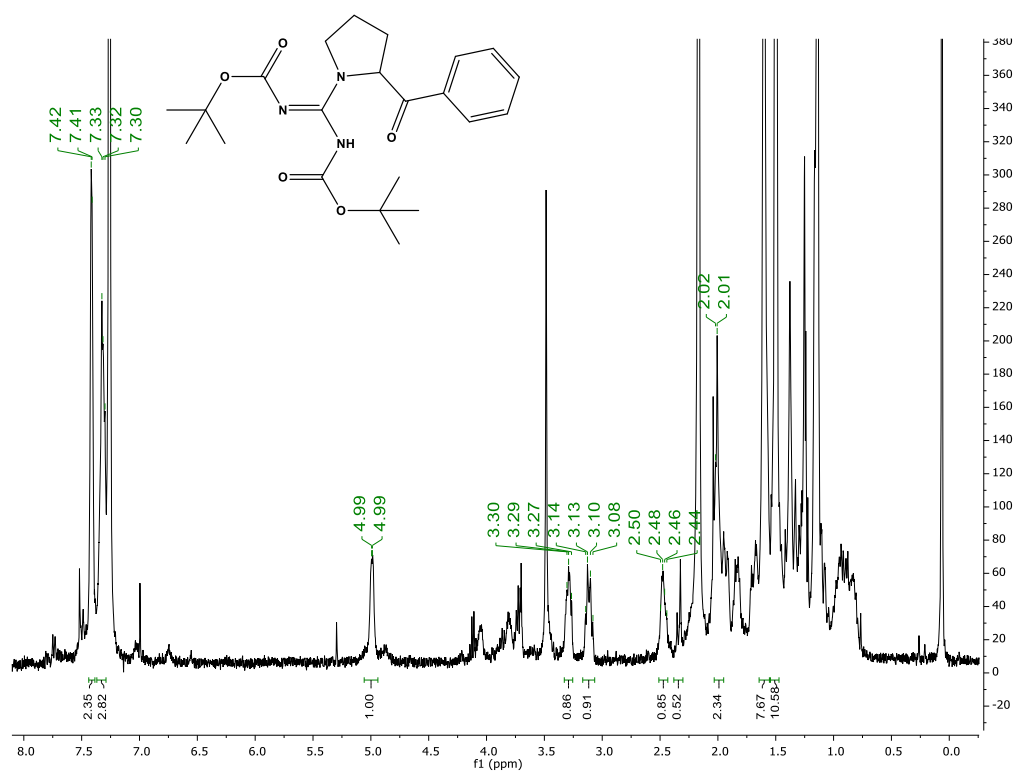
Anexo 2 - Espectro de ^1H -RMN dos compostos **14** (N-Troc-aziridina) e respectivo isocianato, **19** (N-Troc-isocianato).



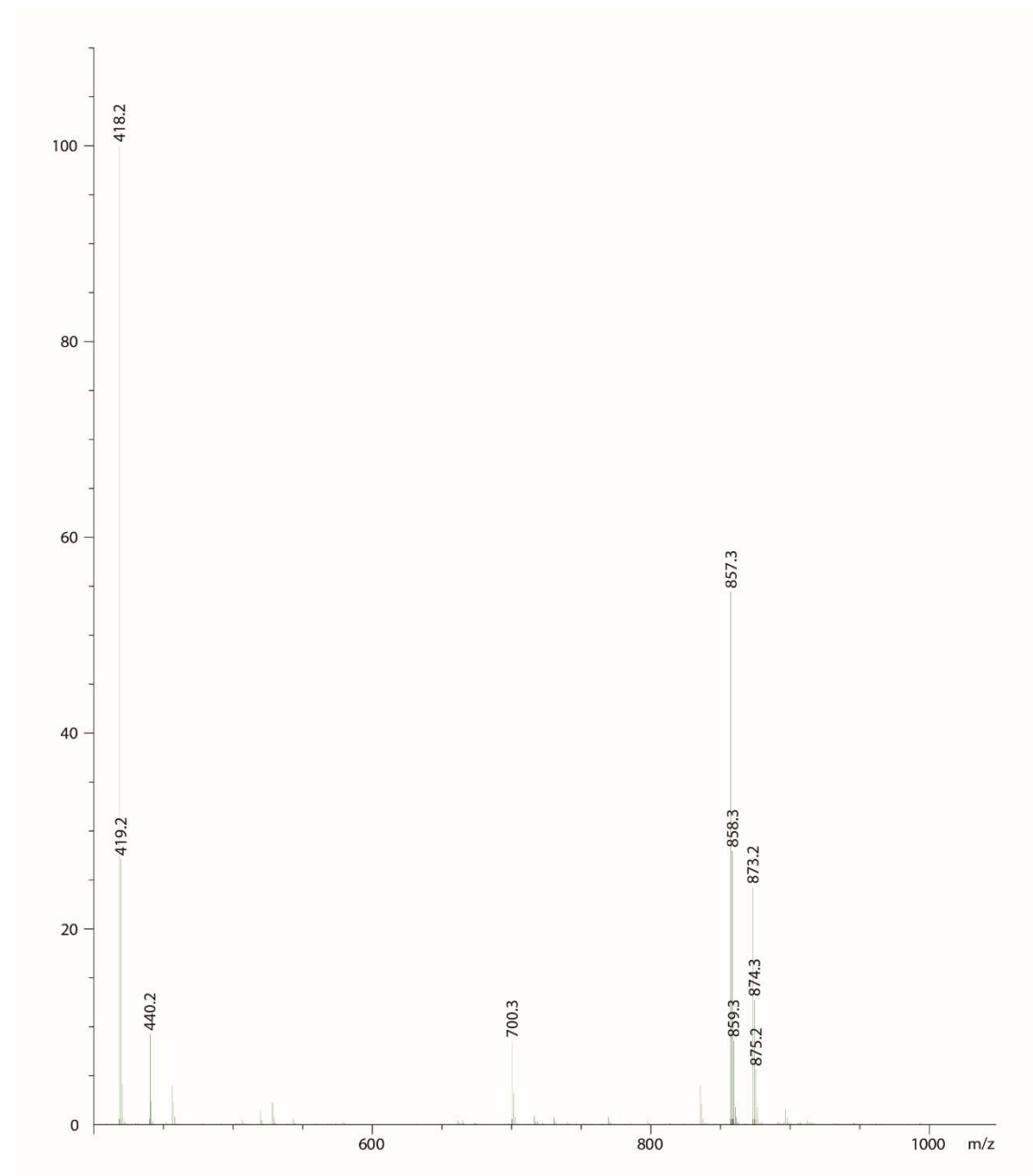
Anexo 3 - Espectro de LC-MS FIA do composto 26.



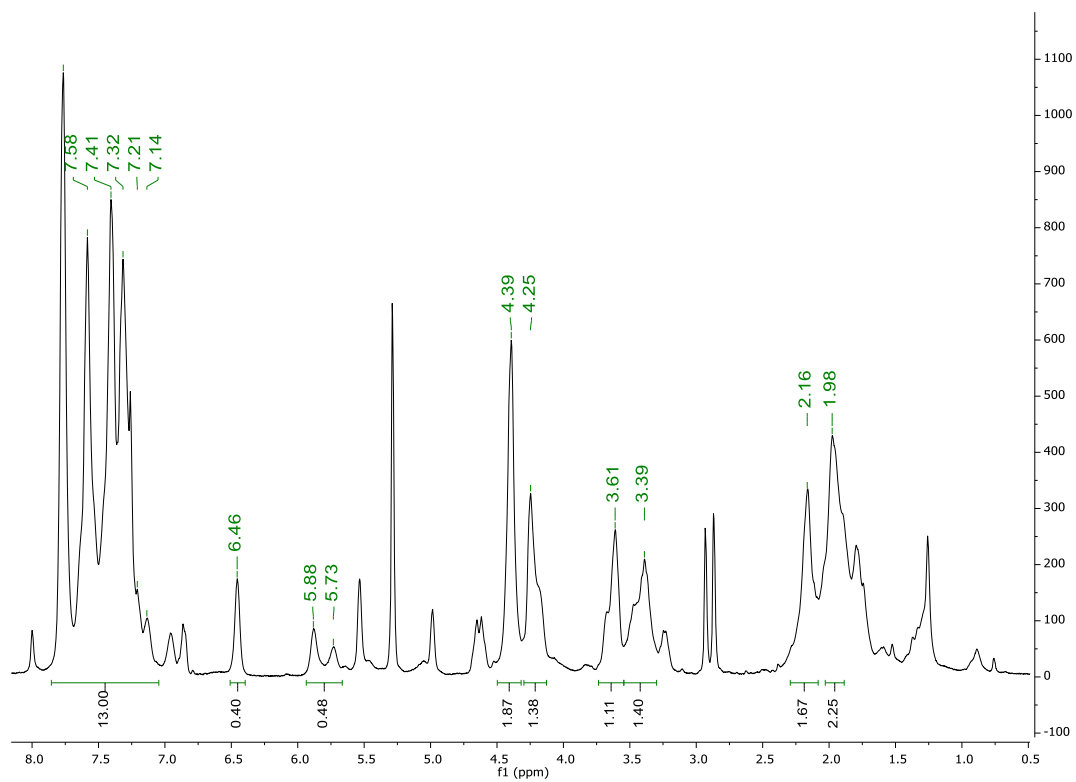
Anexo 4 - Espectro de LC-MS FIA do composto 28.



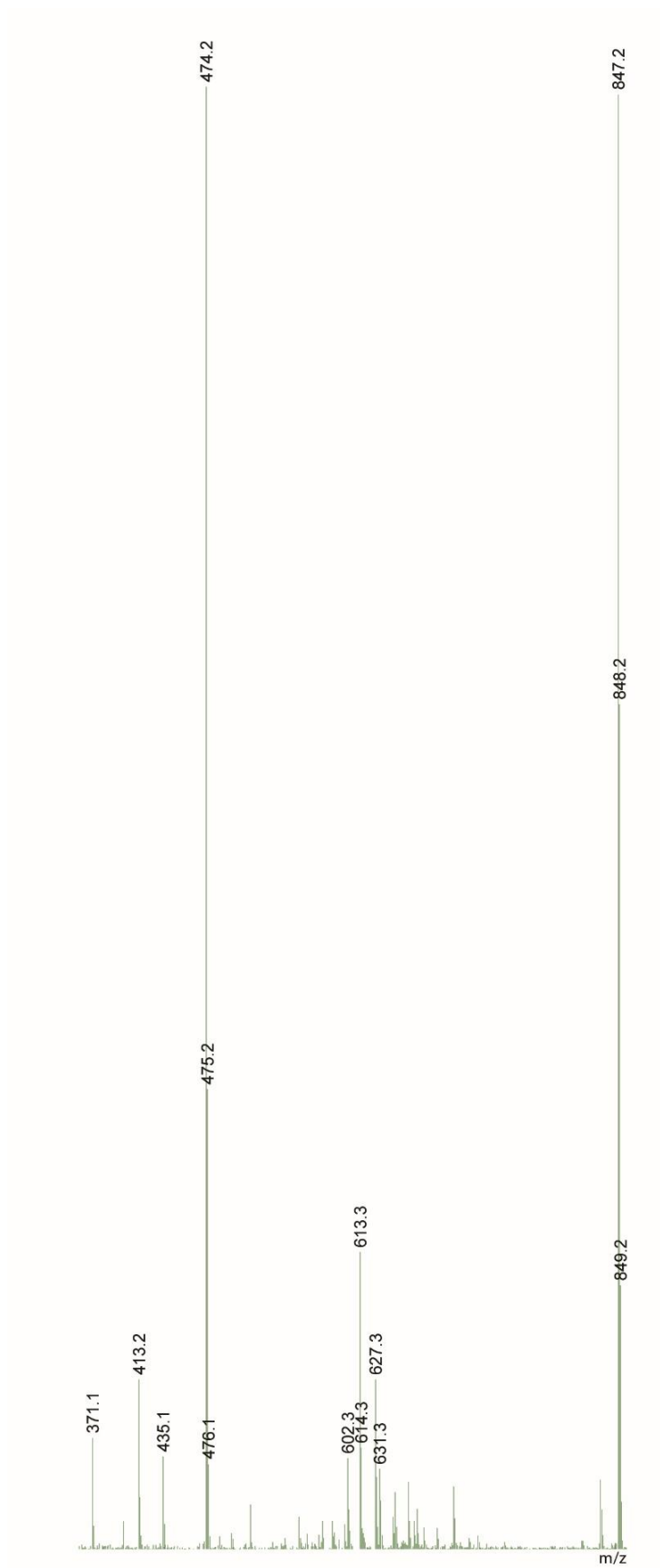
Anexo 5 – Espectro de ^1H -RMN do composto **31.**



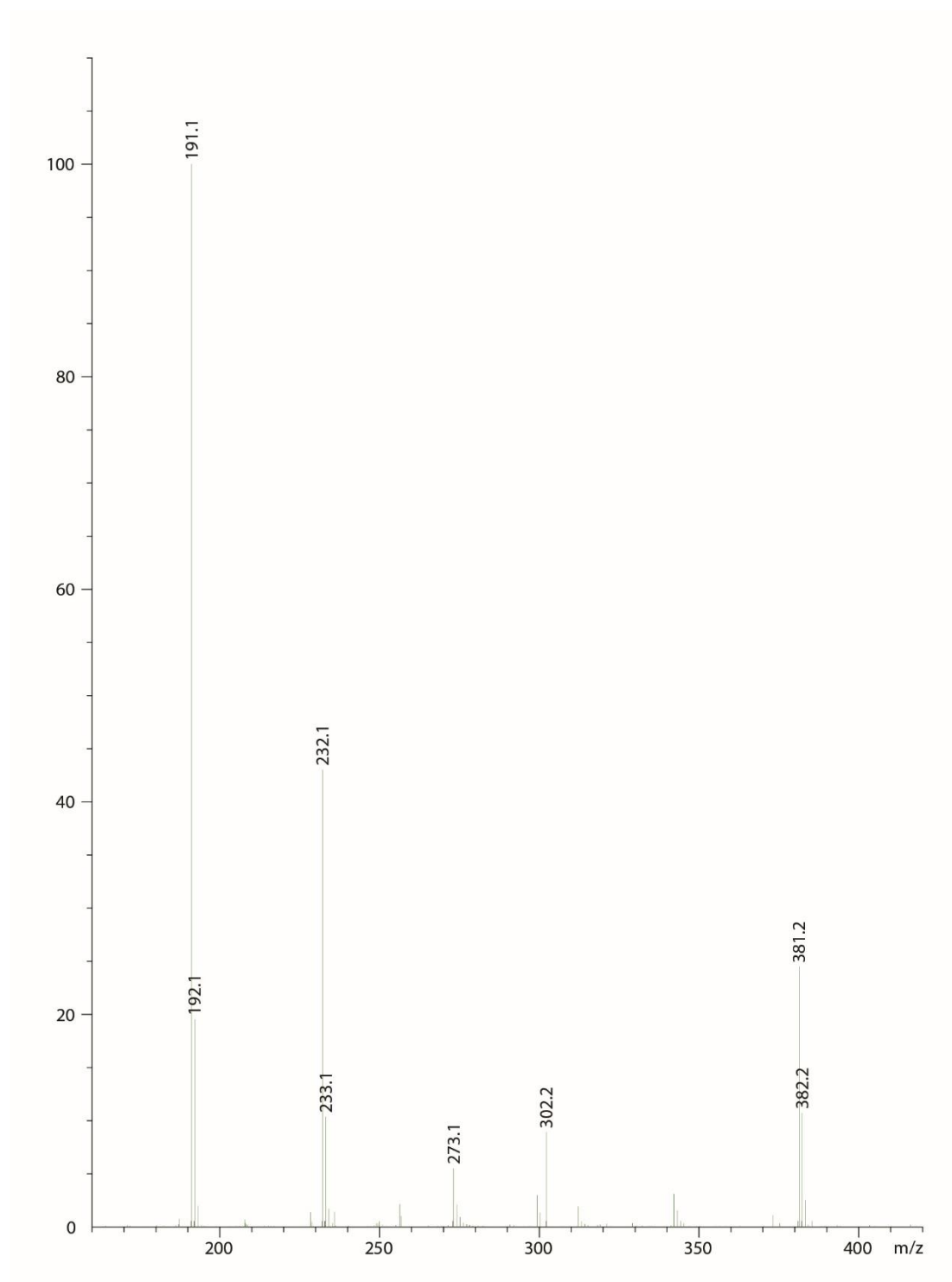
Anexo 6 - Espectro de LC-MS do composto 31.



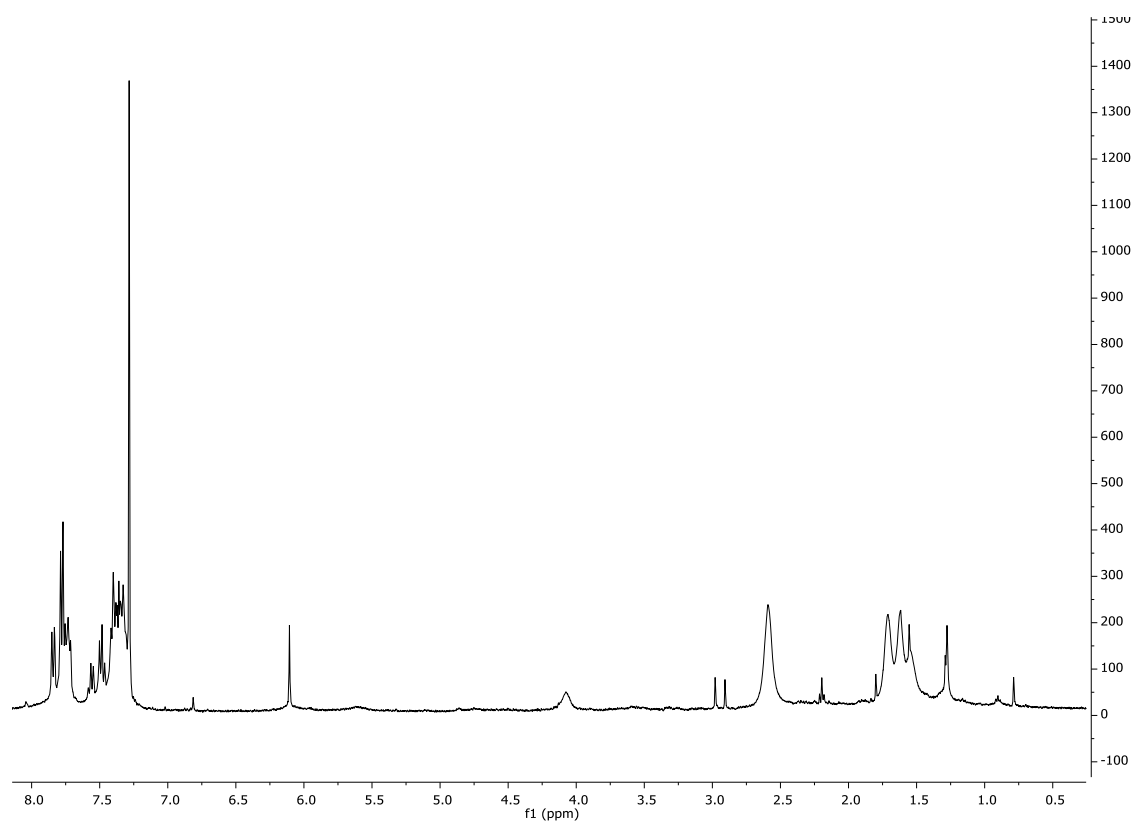
Anexo 7 - Espectro de ^1H -RMN do composto 30.



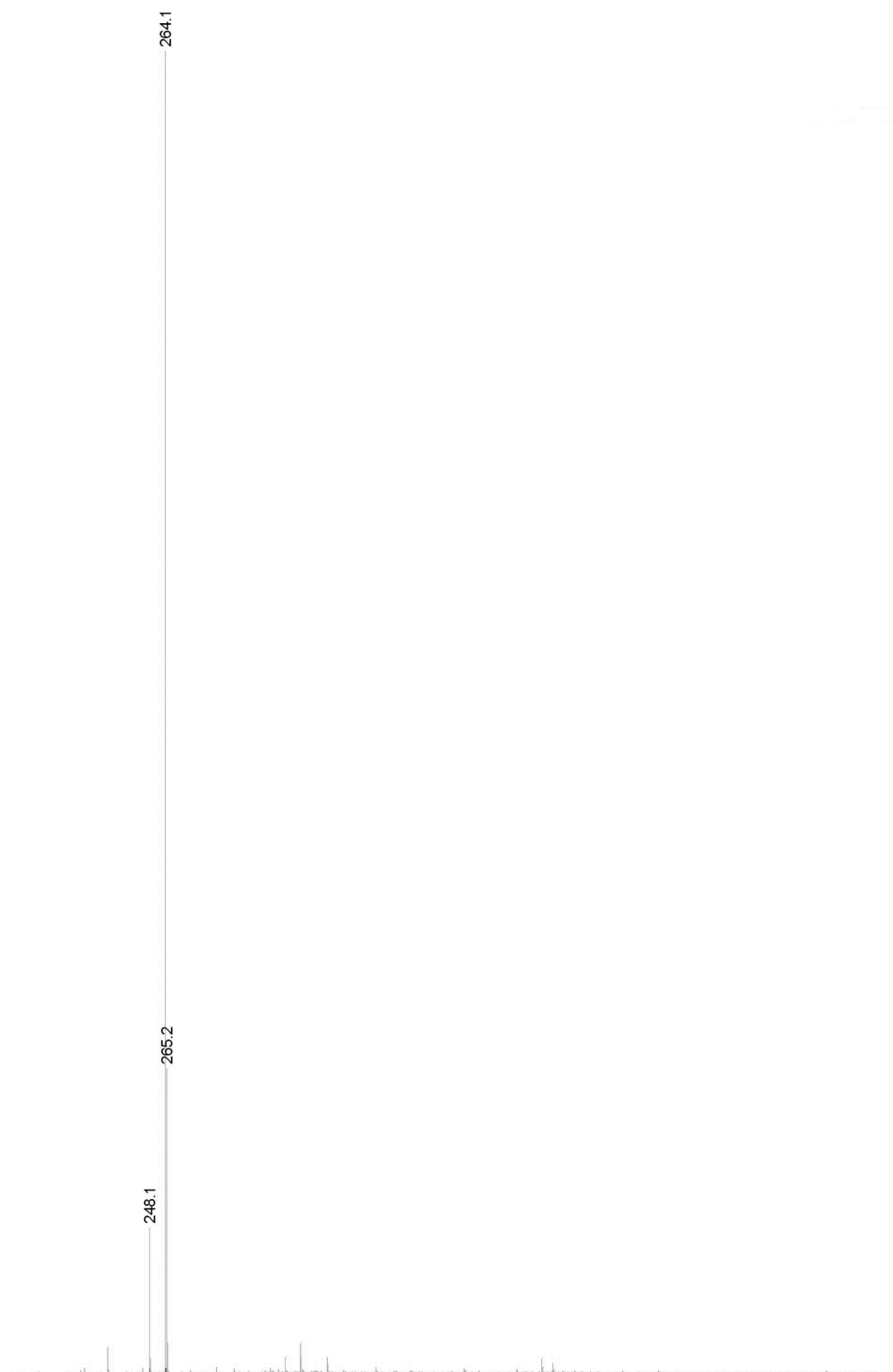
Anexo 8 - Espectro de LC-MS do composto **30**.



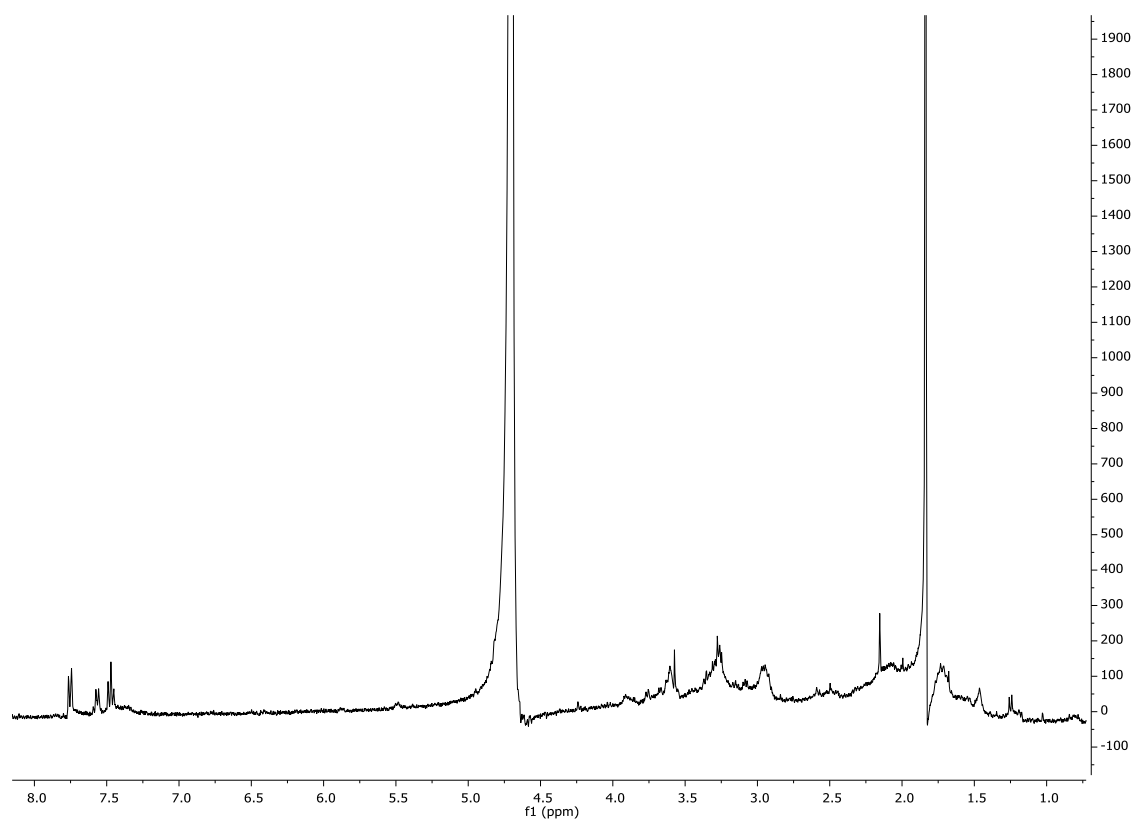
Anexo 9 - Espectro de LC-MS do composto 36.



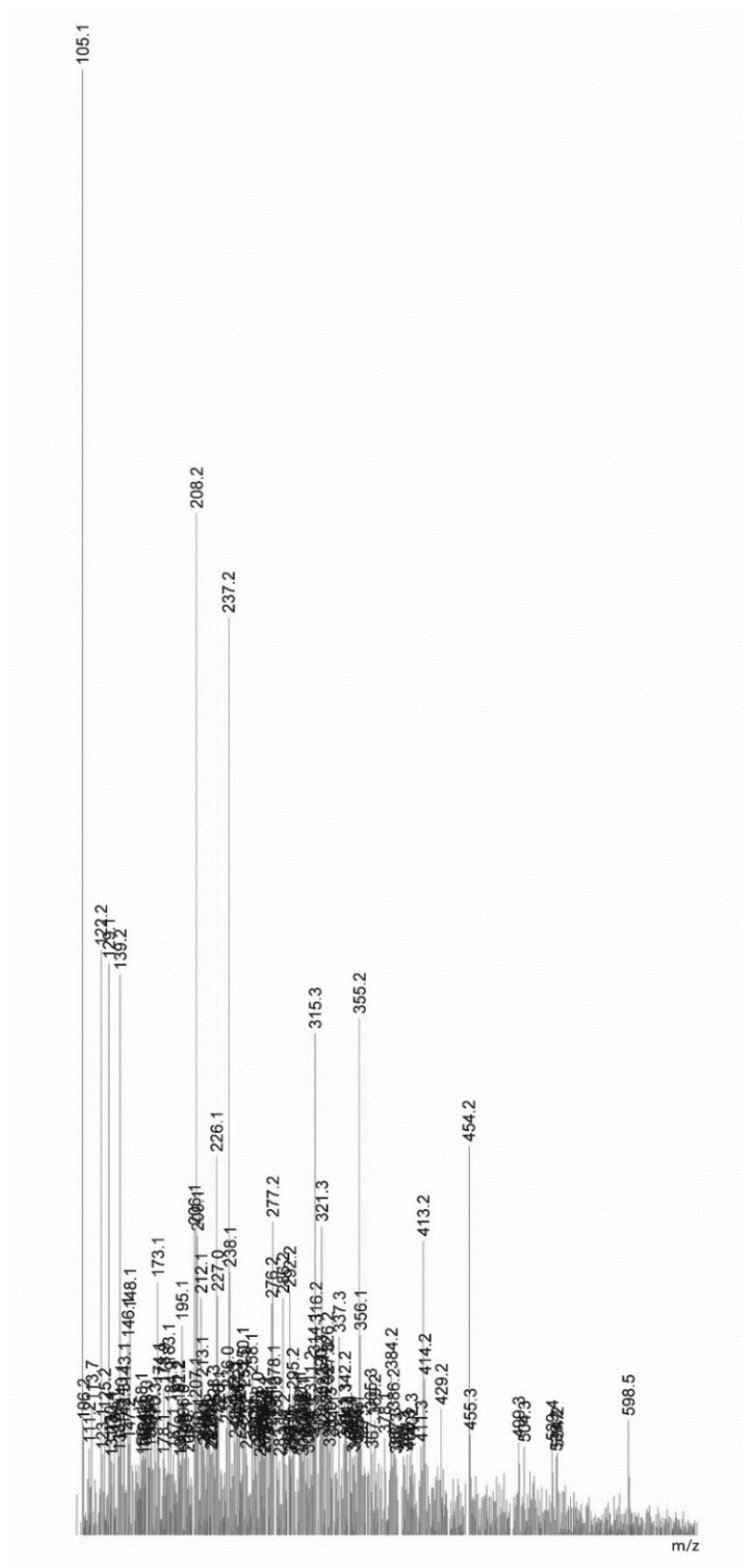
Anexo 10 - Espectro de ^1H -RMN da fase orgânica obtida na reação de remoção do grupo protetor Fmoc do composto **30**.



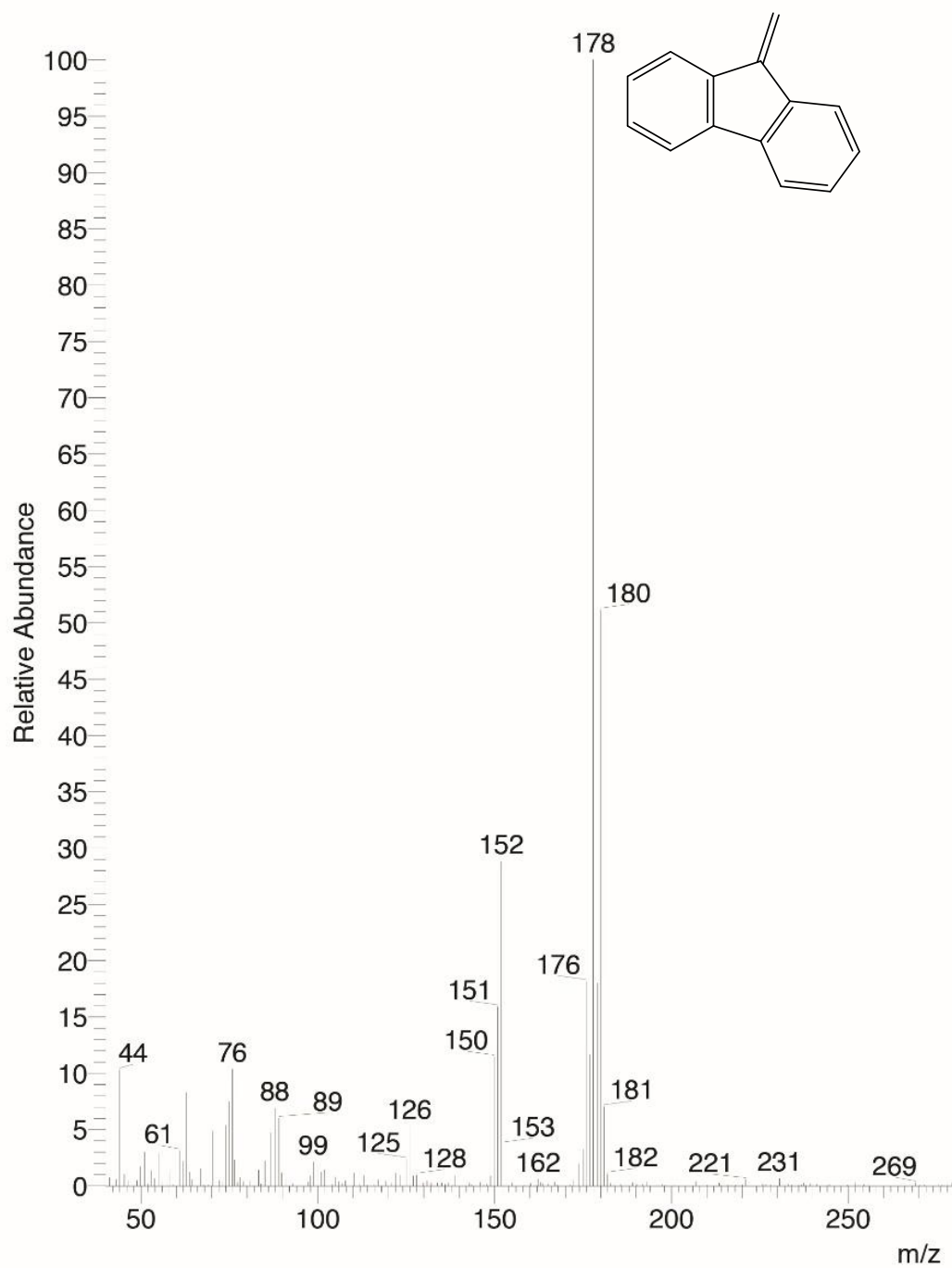
Anexo 11 - Espectro de LC-MS, da fase orgânica obtida da reação de remoção do grupo protetor Fmoc do composto **30**.



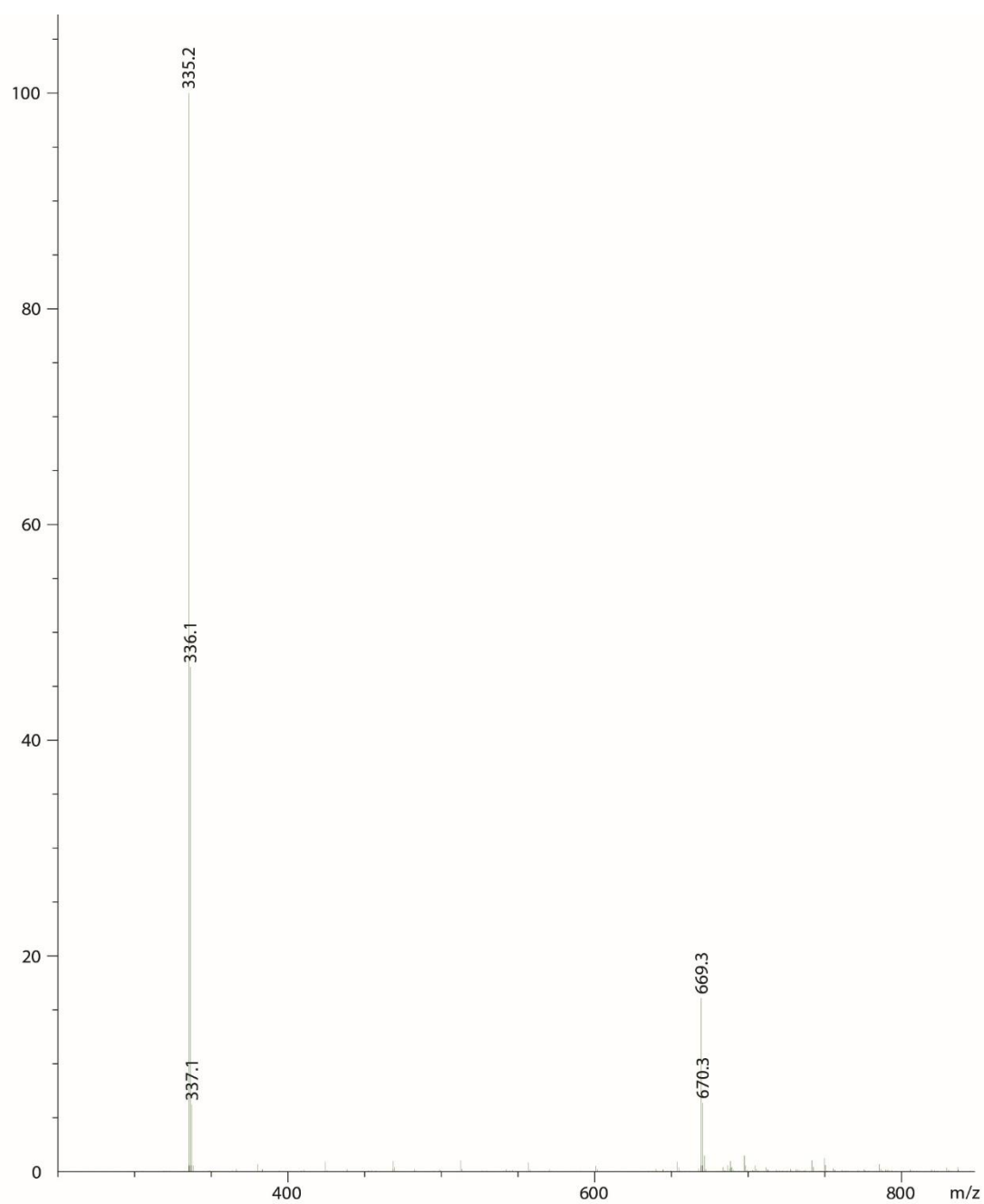
Anexo 12 - Espectro de ^1H -RMN da fase aquosa obtida na reação de remoção do grupo protetor Fmoc do composto **30**.



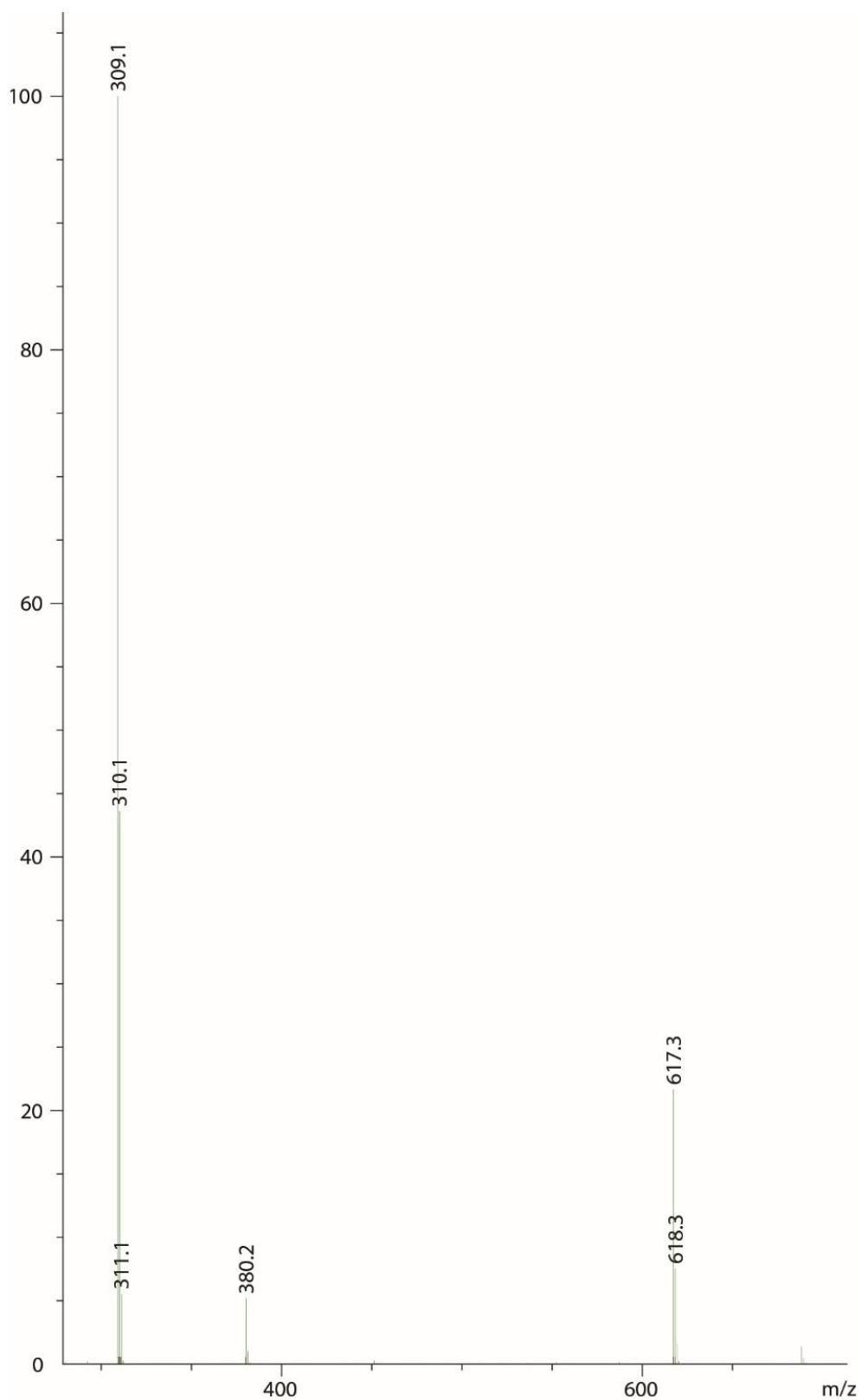
Anexo 13 - Espectro de GC-MS, da fase aquosa obtida na reação de remoção do grupo protetor Fmoc do composto **30**



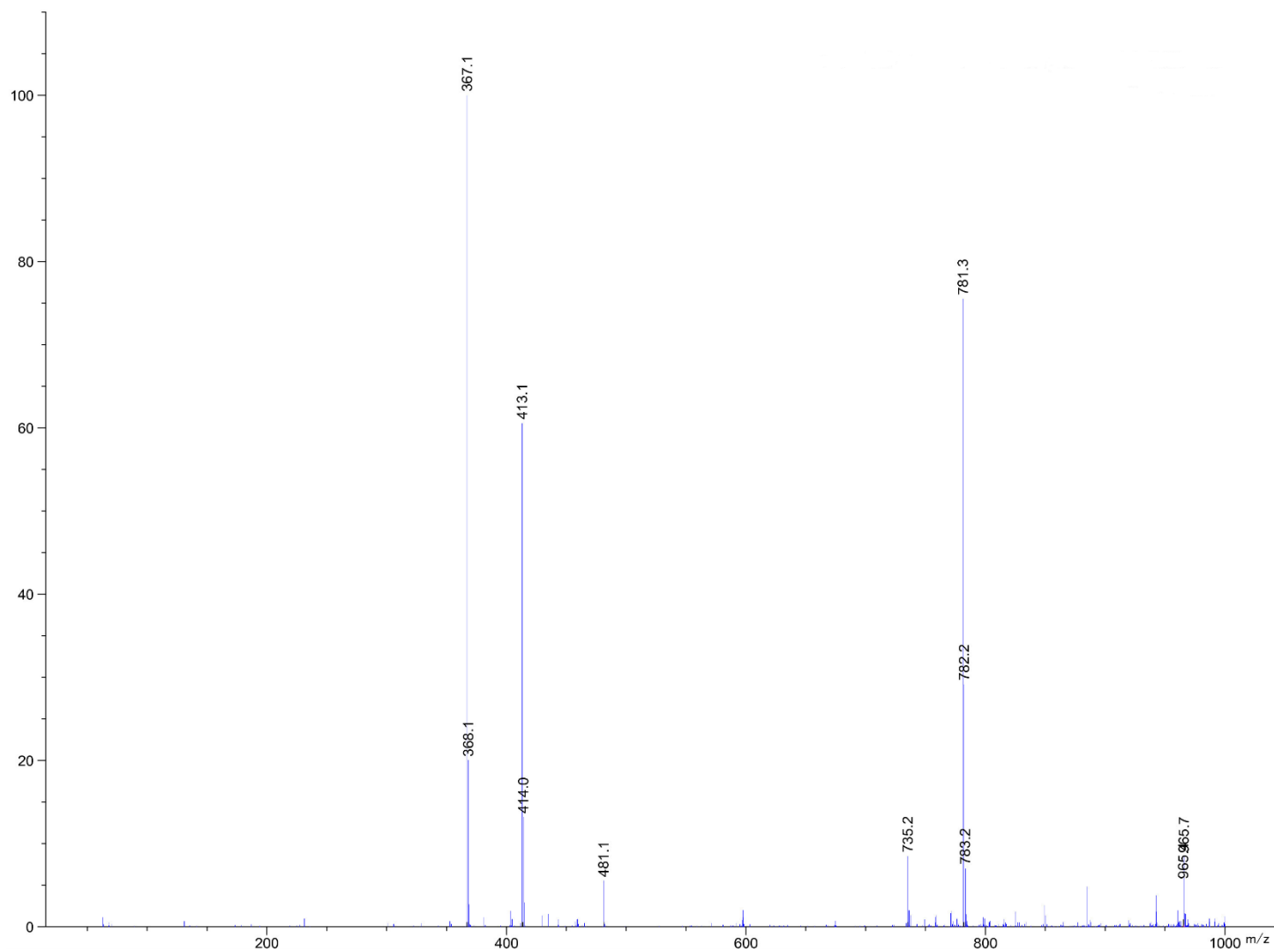
Anexo 14 - Espectro de GC-MS obtido para os compostos **40** e **41**.



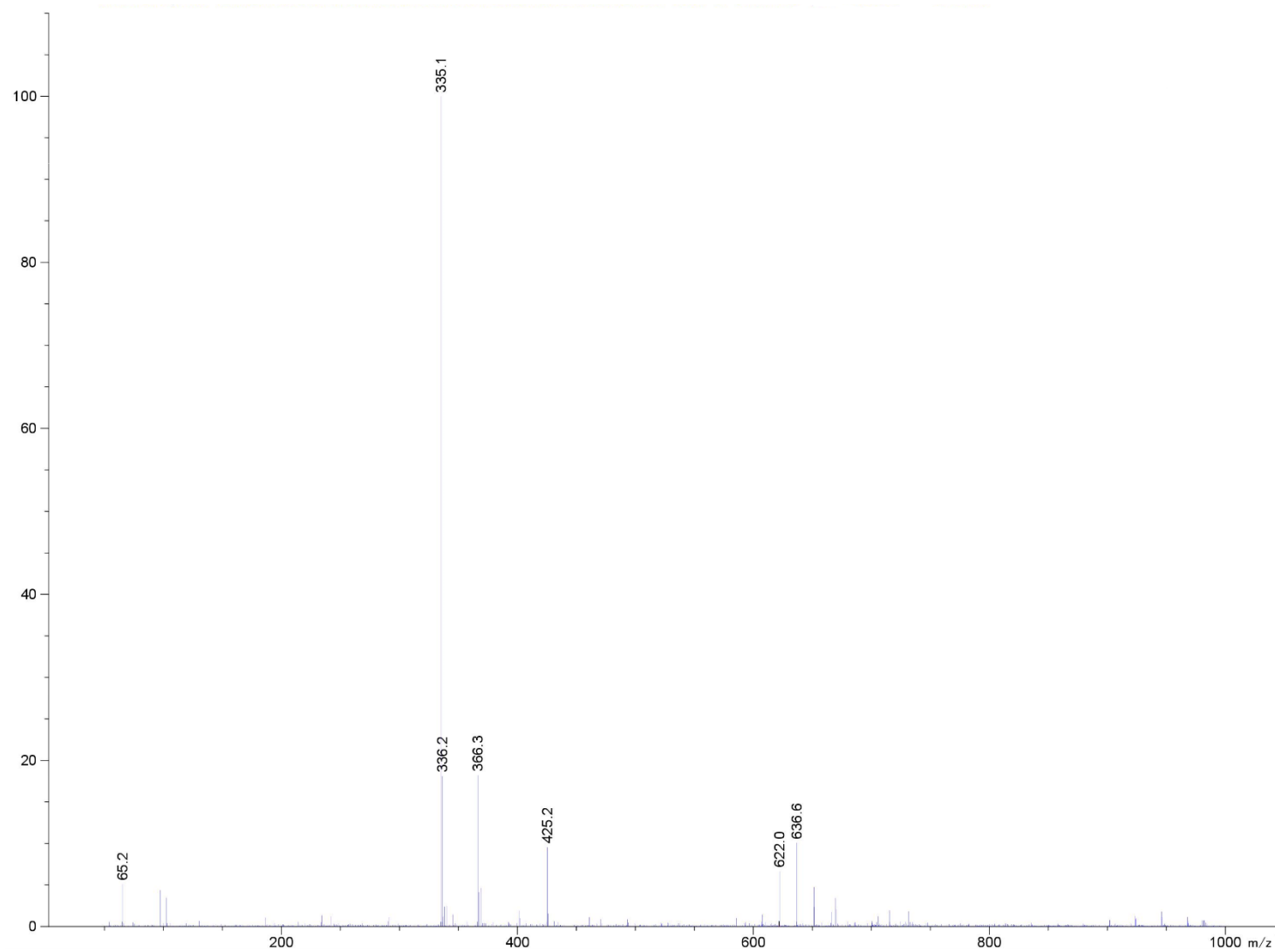
Anexo 15 - Espectro de LC-MS, dos compostos 44 e 45.



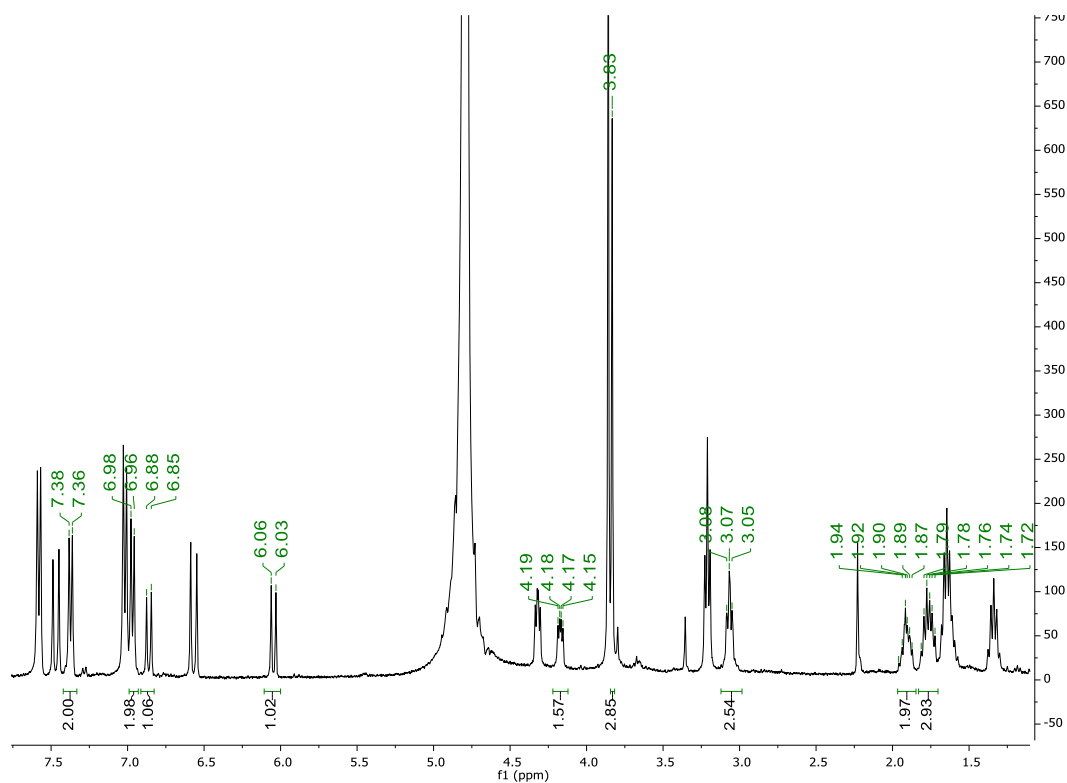
Anexo 16 - Espectro de LC-MS, do composto 53.



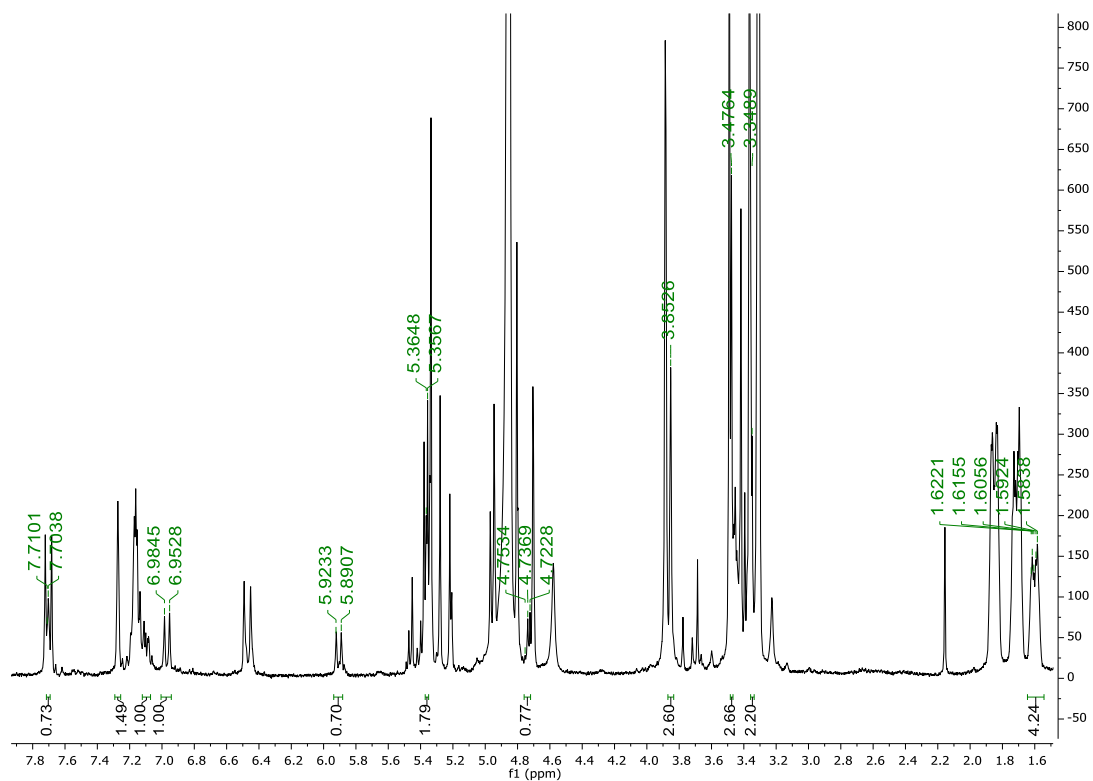
Anexo 17 - Espectro de LC-MS dos compostos **59 e **60**, modo negativo.**



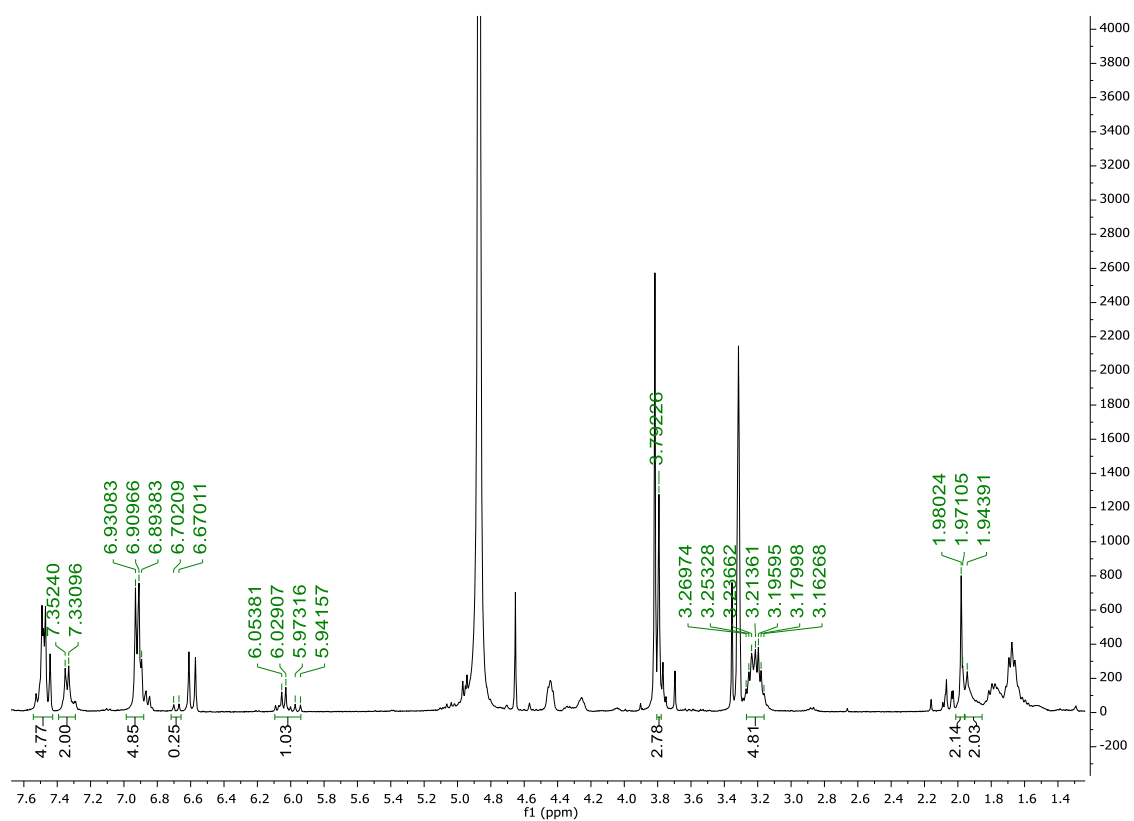
Anexo 18 - Espectro de LC-MS dos compostos **59** e **60**, modo positivo.



Anexo 19 - Espectro de ^1H -RMN obtido para a mistura **44** e **45**, com integração para o composto **45**.



Anexo 20 - Espectro de ^1H -RMN obtido para a mistura **55** e **56**, com integração para o composto **56**.



Anexo 21 - Espectro de ^1H -RMN obtido para a mistura **59** e **60**, com integração para o composto **60**.